

CONS to EP 1364657

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 8 月 22 日 (22.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/064159 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/21, 38/17, 39/395, 45/00, A61P 35/00, 35/02, 19/00, C12Q 1/02, 1/66, 1/68, C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00989

(22) 国際出願日: 2002 年 2 月 6 日 (06.02.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-031492 2001 年 2 月 7 日 (07.02.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小坂 昌明 (KOSAKA, Masaaki) [JP/JP]; 〒770-8075 徳島県徳島市八万町千鳥 1-1-10 Tokushima (JP). 尾崎 修治 (OZAKI, Shuji) [JP/JP]; 〒770-0045 徳島県徳島市南庄町 3 丁目 8 Tokushima (JP). 若原 裕二 (WAKAHARA, Yuji) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 135 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR TUMOR IN HEMATOPOIETIC ORGANS

(54) 発明の名称: 造血器腫瘍の治療剤

(57) Abstract: HM1.24 antigen expression inducers or potentiators in tumor cells in hematopoietic organs which contain as the active ingredient interferon α , interferon β or IRF-2 protein; and antitumor agents for tumor in hematopoietic organs comprising these inducing agents or potentiators combined with an antibody against HM1.24.

(57) 要約:

インターフェロン α 、インターフェロン γ または IRF-2 蛋白質を有効成分とする、造血器腫瘍細胞における HM1.24 抗原の発現の誘導又は増強剤、並びに該誘導剤又は増強剤と HM1.24 に対する抗体との組合せから成る、造血器腫瘍に対する抗腫瘍剤。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/064159 A1

明 細 書

造血器腫瘍の治療剤

発明の分野

本発明は、骨髓腫におけるHM1.24抗原の発現増強剤としてのインターフェロン α 及びインターフェロン γ 並びに IRF-2蛋白質の使用に関する。

また、本発明は、リンパ球系腫瘍におけるHM1.24抗原の発現増強剤としてのインターフェロン α およびインターフェロン γ 並びに IRF-2 蛋白質の使用に関する。さらに、本発明は、抗HM1.24抗体とインターフェロン α またはインターフェロン γ とを用いて白血病を治療する方法に関する。

背景技術

正常ヒト末梢血中に存在する白血球 (leukocyte) には、顆粒球 (granulocyte)、単球 (monocyte) およびリンパ球 (lymphocyte) があり、顆粒球はさらに細胞質内の特殊顆粒の染色性によって、好中球 (neutrophil)、好酸球 (eosinophil)、好塩基球 (basophil) に分けられる。これらの血球の産生は、共通の未分化な造血幹細胞から骨髓球系幹細胞およびリンパ球系幹細胞が分化し、さらにこれらの幹細胞から最終的に各系統の白血球が分化する。これら造血幹細胞を含めた血球系細胞は造血器細胞ともよばれている。造血器細胞の腫瘍 (造血器腫瘍) には白血病、リンパ腫、骨髓腫等がある。

白血病は造血器細胞が腫瘍化した疾患であり、骨髓が白血病細胞により占拠され、正常造血機能が抑制されるために、正常血液細胞

の産生が低下し、貧血、白血球減少症と血小板減少症が現れる。また、白血病細胞の発生源から骨髓性白血病 (myelocytic leukemia) とリンパ球性白血病 (lymphocytic leukemia) に二大別され、さらにそれぞれ急性と慢性に分けられる。尚、亜型として、骨髓系とリンパ球系の二系統の細胞形質を有する系統混合白血病 (mixed lineage leukemia) も知られている。

腫瘍化は造血幹細胞レベルでおこり、分化、成熟のある一定の段階で分化が停止し、それより上流の細胞のみで腫瘍を構成している場合と、生体の調節能を逸脱し自律性増殖を示すものの、分化・成熟能を保持している場合がある。前者には急性白血病 (acute leukemia) が、後者には慢性白血病 (chronic leukemia) や骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome) が含まれる。急性白血病は、増殖細胞の帰属から、急性骨髓性白血病 (acute myelocytic leukemia; AML)、急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia; AMoL)、急性赤白血病 (acute erythroleukemia)、巨核芽球性白血病 (megakaryoblastic leukemia)、急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia; ALL)、に大別される。

また、亜型として急性前骨髓性白血病 (acute promyelocytic leukemia; APL) が知られている。尚、急性白血病と骨髓異形成症候群は、FAB分類 (French-American-British classification) により分類することができる。FAB分類では、急性リンパ性白血病はL1、L2、L3に分類され、例えば、パーキットリンパ腫はL3に分類される。また、急性骨髓性白血病は、M0、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7に分類され、例えば、赤白血病はM6に、巨核芽球性白血病はM7に分類される。これらの分類方法、検査方法は周知であり、多くの成書に記載されている (例えば、新臨床内科学、高久史麿、尾形悦郎、医学書院、1999)。

慢性白血病も増殖細胞も帰属から、慢性骨髄性白血病 (chronic myelocytic leukemia ; CML) と慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia ; CLL) に分類される。また、慢性骨髄性白血病の亜型として、慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia) が知られ、慢性リンパ性白血病の亜型として前リンパ球性白血病 (prolymphocytic leukemia) が知られている。

リンパ腫は、リンパ節などのリンパ組織を構成する細胞に由来する腫瘍の総称であり、主にリンパ球の腫瘍化によって引き起こされる造血器細胞腫瘍である。悪性リンパ腫 (Malignant lymphoma) は、ホジキン病 (Hodgkin's disease) と非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin lymphoma ; NHL) に分けることができるが、いずれもリンパ球系細胞が腫瘍化したもので、T細胞系またはB細胞系に分けることができる。

非ホジキンリンパ腫には、B細胞系腫瘍である濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、Burkitt リンパ腫、pre-B リンパ腫等がある。また、T細胞系腫瘍では、成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia ; ATL) や非ATL 末梢性Tリンパ腫 (PNTL) が知られている。また、T細胞とB細胞の2型のあるびまん性リンパ腫も非ホジキンリンパ腫に含まれる。さらに、亜型として、B細胞系腫瘍であるヘイリー細胞 (有毛細胞) 白血病 (hairy cell leukemia) が知られている。

リンパ球性白血病やリンパ腫は、リンパ球の主要構成細胞が腫瘍化したものであり、リンパ球系腫瘍とも呼ばれ、B細胞腫瘍とT細胞腫瘍に大別される。例えば、B細胞腫瘍には急性Bリンパ性白血病 (B-ALL) 、慢性Bリンパ性白血病 (B-CLL) 、pre-Bリンパ腫、Burkittリンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫等が含まれる。T細胞腫瘍には、急性Tリンパ性白血病 (T-

ALL)、慢性Tリンパ性白血病(T-CLL)、成人T細胞白血病(ATL)、非ATL末梢性Tリンパ腫(PNLT)等が含まれる(図解臨床癌シリーズ、NO.17 白血病・リンパ腫、杉村隆ら、MEDICAL VIEW社、1987; B細胞腫瘍、高月清、西村書店 1991; 新臨床内科学、高久史麿、尾形悦郎、医学書院、1999)。尚、骨髄腫もリンパ系腫瘍のひとつであるが、特徴的な臨床所見を呈する。

骨髄腫(myeloma)は、形質細胞種(plasmacytoma)、多発性骨髄腫(multiple myeloma)とも呼ばれ、モノクローナルな形質細胞の骨髄内集積を特徴とする腫瘍性疾患である。骨髄腫は、免疫グロブリンを産生し分泌する終末分化B細胞、すなわち形質細胞がモノクローナルに主として骨髄において増加する疾患で、この疾患の患者の血清中にはモノクローナルな免疫グロブリンもしくはその構成成分であるL鎖、H鎖などが検出される。

骨髄腫の治療としては、これまで化学療法剤等が使用されているが、完全寛解に導き、患者の生存期間を延長するような有効な治療剤は見いだされておらず、新たな作用メカニズムによる治療効果を有する薬剤の登場が待たれていた。また、リンパ腫や白血病では、ある程度有効な化学療法が開発されているが、副作用の点から新たな薬剤が望まれていた。

一方、Goto, T.らは、ヒト骨髄腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体(マウス抗HM1.24抗体)を報告している(Blood (1994) 84, 1922-1930)。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと(小阪昌明ら、日本臨床(1995) 53, 627-635)から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。

また、上記Blood (1994) 84, 1922-1930には、抗HM1.24抗体が、*in vitro*において、ヒト骨髓腫細胞株RPMI8226に対して細胞傷害活性を有することが述べられている。また、マウス抗HM1.24抗体をキメラ化したキメラ抗HM1.24抗体、およびヒト型化した再構成抗HM1.24抗体が、骨髓腫細胞に特異的に結合すること、さらには細胞傷害活性を有することが示されている (Blood (1999) 93, 3922-3930)。

一方、リンパ球系腫瘍に関しても、抗HM1.24抗体が認識する抗原タンパク質がリンパ球系腫瘍に発現していること、および抗HM1.24抗体がリンパ球系腫瘍に対し、CDC 活性やADCC活性による細胞傷害活性を有し、抗腫瘍効果を発現することが示されている (W098/35698)。このように、HM1.24抗原は、終末分化B細胞である骨髓腫細胞のみならず、リンパ球系腫瘍においても高発現しており、HM1.24抗原を認識する抗HM1.24抗体は、リンパ球系腫瘍の治療剤として有用であることが示されている。

このように、HM1.24抗原は、終末分化B細胞である骨髓腫細胞やリンパ球系腫瘍細胞に特異的に高発現しており、この抗原を認識する抗HM1.24抗体は、細胞表面のHM1.24抗原分子数に比例して殺細胞活性を発揮することから、抗HM1.24抗体を用いた免疫療法は多発性骨髓腫やリンパ球系腫瘍に有効な治療法と考えられる。従って、抗HM1.24抗体の抗原であるHM1.24抗原の細胞表面上の発現量を増強することができれば、より少量の抗体投与により同等の細胞傷害活性が期待でき、副作用をより低下させることが可能となる。

さらに、HM1.24抗原を発現していない造血器腫瘍細胞に対して、細胞表面上のHM1.24抗原の発現量を増強することができれば、通常は抗HM1.24抗体単独では効果を示さない造血器腫瘍細胞に対しても、抗HM1.24抗体によるADCC活性やCDC 活性を介した細胞傷害活性、

殺細胞活性を期待することができる。

一方、ウイルス増殖抑制活性を示す物質として発見されたインターフェロンは、現在、ほ乳類においては、 α 、 β 、 γ 及び ω の4種類に分類され、多彩な生理活性を有することが知られている (Pestka, S., et.al., Ann.Rev.Biochem. (1987) 56, 727-777; Langer, J.A., et.al., Immunology Today (1988) 9, 393-400)。しかしながら、インターフェロン α およびインターフェロン γ が、骨髄腫細胞やリンパ球系腫瘍等の造血器腫瘍細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加させる作用を有することについては報告がなかった。

他方、インターフェロン調節因子(interferon regulatory factor)(IRF)-1 および 2 は、IFN- β 遺伝子の転写調節因子として同定された。IRF-1 および 2 は一般に同じ遺伝子制御配列に結合し、IRF-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF-2 を高発現させたNIH3T3細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルロースゲルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF-2 は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。

一方、最近の研究の進展により、IRF-2 が細胞周期の調節に働くヒストンH4の発現に必要であることが示されている。また、IRF-2 は筋肉細胞においてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の発現を上昇させることが示され、VCAM-1の活性化にはIRF-2 の酸性領域(182 から218)が作用していることも明らかになっている。このことからIRF-2 は転写抑制因子として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。

しかしながら、IRF-2蛋白質がHM1.24抗原遺伝子のプロモーター(HM1.24プロモーター)に結合し、該プロモーターを活性化することは知られていなかった。

発明の開示

現在行われている骨髄腫の治療は、上記のごとく、未だ完全ではなく、骨髄腫を完全寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。抗HM1.24抗体による骨髄腫の治療は、特異性及び有効性の点で画期的な治療剤となる可能性があり、抗HM1.24抗体の作用をより効果的に発揮させる方法が望まれている。

また、現在行われているリンパ球系腫瘍の治療には、種々の化学療法、X線療法、骨髄移植等が挙げられるが、いずれの治療方法も未だ完全ではなく、リンパ球系腫瘍を寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。さらには、リンパ性白血病以外の白血病、すなわち、急性骨髄性白血病や慢性骨髄性白血病等の骨髄性白血病に効果のある治療法が待たれている。これら骨髄腫、リンパ球系腫瘍、骨髄性白血病を、寛解に導き、患者の生存期間を延長させることができる薬剤や治療方法は、造血器腫瘍全般の治療薬、治療方法となりうる。

従って、本発明の目的のひとつは、骨髄腫細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加させることで、抗HM1.24抗体の骨髄腫抑制作用を増強させる手段を提供することである。

また、本発明のもうひとつの目的は、リンパ球系腫瘍において、HM1.24抗原の発現量を増加させることで、抗HM1.24抗体のリンパ球系腫瘍抑制作用を増強させる手段を提供することである。

さらに、本発明のさらなる目的は、骨髄性白血病において、HM1.24抗原の発現を新たに誘導する手段を提供し、抗HM1.24抗体による骨髄性白血病抑制作用を誘導する手段を提供することである。

これらは、HM1.24抗原の発現量を増強するか、もしくは、新たにHM1.24抗原を誘導する手段を用いて、抗HM1.24抗体により造血器腫

瘍を治療する手段を提供するものである。

本発明者らは、かかる方法を提供すべく、HM1.24抗原の発現量を増加させるまたは新たにHM1.24抗原を細胞表面上に発現させる薬剤を探索した結果、インターフェロン α 、インターフェロン γ およびIRF-2蛋白質が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明は、インターフェロン α 、インターフェロン γ 、またはIRF-2蛋白質を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の造血器腫瘍細胞における発現増強剤または発現誘導剤を提供する。

前記造血器腫瘍は、例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫などであり、この白血病としては急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病などが挙げられ、前記リンパ腫としては、ホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫、B細胞性非ホジキンリンパ腫などが挙げられ、前記骨髄腫としては多発性骨髄腫が挙げられる。

本発明者はまた、上記のHM1.24抗原発現増強剤または発現誘導剤によりHM1.24抗原が発現した造血器腫瘍細胞に、該HM1.24抗原に特異的に結合する抗原を結合させることにより、該造血器腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を増強することができることを見出した。

従って本発明はまた、インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2蛋白質と併用することを特徴とし、有効成分として配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を含んでなる造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物を提供する。

本発明はまた、有効成分として（1）インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2蛋白質、および（2）配列番号：2に

示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体、を含んでなる造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物を提供する。

本発明はまた、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体と併用することを特徴とし、有効成分として、インターフェロン α 、インターフェロン γ 、またはIRF-2蛋白質を含む造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物を提供する。

前記の造血器腫瘍は、例えば、白血病、リンパ腫または骨髄腫である。上記白血病としては急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病などが挙げられ、上記リンパ腫としてはホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫、B細胞性非ホジキンリンパ腫などが挙げられ、そして上記骨髄腫としては多発性骨髄腫等が挙げられる。

前記抗体は、好ましくは細胞傷害活性を有する抗体であり、この細胞傷害活性は例えばADCC活性である。抗体は好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、またはヒト抗体である。モノクローナル抗体は、好ましくは寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体であり、前記キメラ抗体またはヒト型化抗体は、好ましくは寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体のキメラ抗体またはヒト型化抗体である。

本発明はさらに、造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、

(1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体；および

(2) 上記抗体を、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤と組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキットを提供する。

本発明はまた、造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、（１）配列番号２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤；および

（２）上記薬剤を、配列番号：２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキットを提供する。

本発明はまた、造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、

（１）配列番号２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤；

（２）配列番号：２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体；および

（３）上記薬剤および抗体を組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキットを提供する。

本発明はまた、HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングする方法であって、

（１）HM1.24遺伝子プロモーター領域を有するレポーター遺伝子を有する細胞を調製する工程；

（２）前記細胞に被験物質を接触させる工程；

（３）レポーター遺伝子の発現を検出する工程、

を含む方法を提供する。

本発明はまた、上記の方法によって選択されるHM1.24抗原の発現増強剤を提供する。

本発明はまた、上記の発現増強剤を含み、配列番号：２に示され

るアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを特徴とする造血器腫瘍治療用医薬組成物を提供する。

本発明はまた、発現を増強する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(1) 細胞と被験物質を接触させる工程；

(2) 前記細胞のIRF-2蛋白の発現量を測定する工程、
を含む方法を提供する。

本発明はまた、上記の方法によって選択されるIRF-2タンパク質の発現増強剤を提供する。

本発明はまた、上記の発現増強剤を含み、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを特徴とする造血器腫瘍治療用医薬組成物を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、インターフェロン α の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した骨髓腫細胞株U266を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図2は、インターフェロン α の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した患者骨髓腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図3は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドにより形質転換したU266細胞をインターフェロン α の非存在下又は種々の濃度での存在下で培養した後ル

シフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

図4は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域の内、転写開始点から151bp上流まで、又は77bp上流までを挿入したレポータープラスミドにより形質転換されたU266細胞又はHEL細胞を、インターフェロン α (1000U/ml)の存在下で培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

図5は、インターフェロン γ の非存在下(上)は存在下(下)で培養した骨髓腫細胞株U266を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図6は、インターフェロン γ の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した患者骨髓腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図7は、U266培養細胞にIFN- α を添加することにより産生されHM1.24プロモーター領域に結合する転写因子の量の経時的変化を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-)は核抽出物添加せず。0hはIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。0.5～8hはIFN- α (1000U/ml)刺激後それぞれの時間経過した核抽出物を添加。+coldは未標識ISRE2プローブ50ng添加、+cold unrelatedは未標識adp配列50ng添加。

図8は、HM1.24プロモーターに結合する転写因子を、各種の抗体を用いて同定した結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-)は核抽出物添加せず。0hはIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。8hはIFN- α (1000U/ml)刺激後8hの核抽出物を添加。+coldは未標識ISRE2プローブ50ng添加。+cold unrelatedは未標識adp配列50ng添加。抗体はそれぞれ2 μ g添加。

図9は、HM1.24プロモーターレポータープラスミドとIRF-2発現プラスミドとをU266細胞に導入し、レポーター活性を測定した場合の結果を示すグラフである。

図10は、ヒト白血病細胞株HEL および急性骨髄性白血病患者から採取した細胞を、インターフェロン α の非存在下（左）または、存在下（右）で培養し、標識としてヒトIgG（対照）または抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。黒塗りが対照であり、白抜きが抗HM1.24抗体による染色を示す。

図11は、急性リンパ性白血病患者およびB細胞性非ホジキンリンパ腫患者から採取した細胞を、インターフェロン α の非存在下（左）または、存在下（右）で培養し、標識としてヒトIgG（対照）または抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。黒塗りが対照であり、白抜きが抗HM1.24抗体による染色を示す。

図12は、T細胞性非ホジキンリンパ腫患者から採取した細胞を、インターフェロン α の非存在下（左）または、存在下（右）で培養し、標識としてヒトIgG（対照）または抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。黒塗りが対照であり、白抜きが抗HM1.24抗体による染色を示す。

図13は、ヒト白血病細胞株HEL を標準細胞とし、健常人の末梢血単核球をエフェクター細胞として用いた際の、種々のヒト型化抗HM1.24抗体によるADCC活性を測定した結果を示す。

発明の実施の形態

インターフェロン α 及びインターフェロン γ

インターフェロンは、ウイルス増殖抑制活性を示す物質として発見されたものであり、現在、哺乳類においては α 、 β 、 γ 、 ω の4

種類が知られている。これらは、ウイルス増殖抑制活性に加え、細胞増殖抑制活性や多彩な免疫調節作用を示すことが知られ、既に医薬品として使用されている（インターフェロン“サイトカイン”、大沢利昭編、（1990）115～133、東京化学同人； Pestka, S. et al., Ann.Rev.Biochem.（1987）56, 727～777； Langer J.A. et al., Immunology Today（1988）9, 393～400）。

本発明で使用するインターフェロン α 及びインターフェロン γ は、HM1.24抗原の発現量を増加させる活性を有する限り変異体を用いることも可能である。HM1.24抗原の発現量を測定するには、実施例に記載されたように、骨髓腫細胞株あるいは骨髓腫患者から採取した骨髓腫細胞を用いて、フローサイトメトリーにより検出することができる。変異体としては、例えば、1もしくは数個、あるいは複数個のアミノ酸残基が、欠失または置換または挿入または付加等により変異されたインターフェロン α 及びインターフェロン γ であってもよい。

欠失または置換または挿入を蛋白に導入する方法としては、対応する遺伝子を改変する部位特異的変異誘発法を用いることができる（Hashimoto-Gotoh, Gene（1995）152, 271-275, Zoller, Methods Enzymol.（1983）100, 468-500, Kramer, Nucleic Acids Res.（1984）12, 9441-8456, Kunkel, Proc.Natl.Acad.Sci. USA（1985）82, 488-492、「新細胞工学実験プロトコル 東京大学医科学研究所 制癌研究部編（1993）p241-248」）。

また、市販のPCRを利用した「部位特異的変異誘発システム（GIBCO-BRL）」や「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」（ストラタジーン社製）を利用することも可能である。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は自然界においても生じることもある。また、この様に変異を導入された蛋白がもとの蛋白と同様の活性を有する

ことは、Mark, Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1984) 81, 5662-5666に示されている。

アミノ酸残基の置換においては、性質の保存されたアミノ酸どうしで置換することが好ましい。例えば、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) どうしの置換が好ましい。

さらに、変異体としては、インターフェロン α 又はインターフェロン γ のペプチド断片を用いることも可能である。特に、インターフェロン α 又はインターフェロン γ 受容体との結合部位を有するペプチド断片が好ましい。好ましくは100個以上、さらに好ましくは130個以上、さらに好ましくは150個、最も好ましくは160個以上の連続するアミノ酸残基から構成されるペプチド断片である。

IRF-2 蛋白質

インターフェロン調節因子(interferon regulatory factor)(IRF)-1 および 2 は IFN- β 遺伝子の転写調節因子として同定された (Taniguchi, T. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 8372 Taniguchi, T. et al., Cell (1989) 58, 729)。IRF-1 および 2 は一般に同じ遺伝子制御配列に結合し、IRF-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF-2 を高発現させた NIH3T3 細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルローズゲルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF-2 は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。

一方、最近の研究の進展により、IRF-2 が細胞周期の調節に働くヒストンH 4 の発現に必要であることが示されている。また、IRF-2 は筋肉細胞においてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の発現を上昇させることが示され、VCAM-1の活性化にはIRF-2 の酸性領域 (182 から218) が作用していることも明らかになっている。このことからIRF-2 は転写抑制因子として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。

ハイブリドーマ

本発明で使用する抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM 1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPMM2 (特開平7-236475) やKPC-32 (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 14 00) を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19 ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19 として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19 を含む大腸菌(E. coli) は、平成5年(1993

年) 10月 5 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に、*Escherichia coli* DH5 α (pRS38-pUC19) として、受託番号 FERM B P-4434 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特開平 7-196694 参照)。このプラスミド pRS38-pUC19 に含まれる cDNA 断片を用いて遺伝子工学的的手法により、抗 HM1.24 抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。

具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4 ~ 21 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), N

S-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG 溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し

、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W093/12227, W092/03918, W094/02602, W094/25585, W096/34096, W096/33735参照）。

さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングにより所望のヒト抗体を単離することもできる。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体として（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、HM1.24抗原を固定化したプレートを用いて、HM1.24抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、HM1.24抗原に結合する抗体の可変領域をコードする遺伝子を同定することができる。これらの遺伝子配列を用いれば、抗HM1.24ヒト抗体を作製することができ

る。これらの方法は既に周知の方法であり、W092/01047, W092/20791, W093/06213, W093/11236, W093/19172, W095/01438, W095/15388を参考にすることができる。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

モノクローナル抗体

具体的には、抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマの作製は、Goto, T.らの方法（Blood（1994）84. 1922-1930）により行うことができる。独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、平成7年4月27日にFERM BP-5233としてブダペスト条約に基づき国際寄託された抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗HM1.24抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-CondimedH1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI 1640培地、ハイブリドーマSFM 培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL製）等で培養し、その培養上清から抗HM1.24抗体を精製する方法で行うことができる。

組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリ

ドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J.M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chmczynski, P. ら、(1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M.A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを

発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号W096/02576参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24L-g κ) およびEscherichia coli

DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1)として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平8-264756参照）。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト

以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR ; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023 、国際特許出願公開番号W096/02576参照)。

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework-region ; FR) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号W096/02576参照)。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

例えば、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVL α -AHM-gk)およびEscherichia coli DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-g γ 1)として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特願平8-264756参照)。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、細胞傷害活性を呈するヒト抗体C領域として、ヒト C γ 例えば、C γ

1, C γ 2, C γ 3, C γ 4 を使用することができる。これらのうち、特に C γ 1, C γ 3 を有する抗体が強力な細胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC 活性を有し、本発明に好適に使用される。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; FR) およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる (W098/14580 参照)。

発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mull

iganらの方法 (Nature (1979) 277, 108) 、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S.P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照) 。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用

する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa, Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology App

lication, 1993)。また、昆虫としては、カイコなどを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコなどを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のようにin vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよい

し、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号W094-11523参照）。

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

抗体の分離、精製

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POROS, Sepharose F.F.等が挙げられる。

その他、通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

抗体の濃度測定

上記方法で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合に

は、本発明で使用する抗体又は抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、 1 mg/ml を1.350Dとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIO SOURCE 製) $100\text{ }\mu\text{l}$ を96穴プレート (Nunc製) に加え、 4°C で一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL 製) $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE 製) $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

FCM解析

骨髓腫細胞と本発明で使用する抗体との反応性は、FCM(フローサイトメトリー) 解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。樹立細胞株としては、骨髓腫由来RPMI8226 (ATCC CCL 155)、同U266(ATCC TIB 196)、同KPMM2、同KPC-32、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL 1621) などを用いることができる。

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液 (2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS(-)) で $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈した抗体あるいはコントロール抗体 $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え、氷温化30分インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ のFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM, Becton Dickinson 製) $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え、氷温

化30分間インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、 $600\mu\text{l}$ あるいは 1ml のFACS緩衝液に懸濁し、FACSscan (Becton Dickinson 製) で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

スクリーニング方法

HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングするには、例えば、無刺激の状態ではHM1.24抗原を発現していないか、あるいは少なく発現している細胞を用いてFCM 解析にて測定することができる。例えば、実施例に記載の細胞を被検物質と1～2日インキュベートし、ついで一次抗体としてマウス抗ヒトHM1.24抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG 抗体により染色する。最後に、細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞のFITC蛍光強度を測定すればよい。

また、前記の間接法による染色ではなく、細胞を高濃度の免疫グロブリンで処理し、Fcレセプターをブロックした後にFITC標識した抗ヒトHM1.24抗体を用いた直接法による染色によりFCM 分析することもできる。

また、HM1.24プロモーター配列を用いたレポーター遺伝子アッセイによりHM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングすることができる。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼを用いることができる。HM1.24プロモーター配列をレポーター遺伝子上流に含むプラスミドを構築し、ついで、細胞に形質転換した後、得られた細胞を被検物質と1～2日培養し、回収された細胞をルシフェラーゼアッセイすることで、HM1.24抗原の発現を増強する薬剤をスクリーニングすることができる。

細胞傷害活性

A D C C 活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞傷害活性として、例えば、ADCC

活性を有する抗体である。

本発明において造血器腫瘍細胞に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球を分離し、エフェクター細胞 (Effector cell : E) として調製する。

また、標的細胞 (Target cell : T) としては、RPMI8226 (ATCC CCL 155), U266 (ATCC TIB 196), KPMM2, KPC-32, ARH-77 (ATCC CRL 1621)、HEL、患者由来の細胞などを ^{51}Cr により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用いることができる。細胞傷害活性 (%) は、 $(A-C)/(B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性 (cpm)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm) である。

細胞傷害活性の増強

ADCC活性のような細胞傷害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域 (C領域) として $C\gamma$ 、特に $C\gamma 1$, $C\gamma 3$ を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。

例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY (1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. et al.

, J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現(Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化(Caron, P.C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化(Wolff, E.A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入(Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384)が挙げられる。

これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

患者の治療

本発明の態様のひとは、HM1.24抗原の発現量を増強する薬剤、または、通常の状態では細胞表面上にHM1.24抗原を発現していない細胞に対してHM1.24抗原の発現を誘導する薬剤と、抗HM1.24抗体を患者に投与することにより、造血器腫瘍を治療する方法に関する。造血器腫瘍としては、例えば、骨髄腫、好ましくは多発性骨髄腫、リンパ球系腫瘍、例えばリンパ腫、好ましくはホジキン病または非ホジキンリンパ腫、リンパ球性白血病、好ましくは、急性Tリンパ性白血病、慢性Tリンパ球性白血病、急性Bリンパ性白血病、慢性Bリンパ性白血病、および骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病である。さらに、FAB分類でL1～L3、M0～M7の急性白血病も含まれる。

HM1.24抗原の発現量を増強する薬剤、または、通常の状態では細胞表面上にHM1.24抗原を発現していない細胞に対してHM1.24抗原の発現を誘導する薬剤としては、インターフェロン α 、インターフェ

ロンγ、IRF-2蛋白質あるいはIRF-2蛋白質をコードするDNAを含むベクターであり、好ましくは、インターフェロンαまたはインターフェロンγである。インターフェロンαまたはインターフェロンγの投与量としては、人体に投与した際に、血中濃度最高値として1～10000 I.U./ml（国際単位）、より好ましくは5～1000 I.U./ml、さらに好ましくは5～500

I.U./ml、最も好ましくは5～50 I.U./mlになる投与量である。

静脈内投与の場合、好ましくは1万～1000万I.U.、より好ましくは10万～1000万I.U.、さらに好ましくは50万～500万I.U.、最も好ましくは、100万～500万I.U.を1回あたり投与することである。インターフェロンと抗HM1.24抗体は、一緒に投与してもよいし、別個に投与してもよい。後者の場合には、まず、インターフェロンを投与し、96時間以内に抗HM1.24抗体を投与することが好ましい。インターフェロン投与と抗HM1.24抗体投与の間隔は、インターフェロン投与によってHM1.24抗原の発現量が増強されている限り制限はないが、好ましくは96時間以内であり、より好ましくは72時間、さらに好ましくは48時間以内である。

患者の臨床応答に応じてインターフェロンと抗HM1.24抗体を複数回、交互に投与することも本発明の範囲内である。投与経路は、血流中に直接投与されることが望ましく、静脈内投与あるいは動脈内投与が好ましい。持続的に投与することも可能であり、点滴静脈内投与でもよい。また、皮下投与や筋肉投与でもよい。

本発明の他の態様は、インターフェロンαまたはインターフェロンγと抗HM1.24抗体を含有する造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物に関わる。本発明の治療剤または医薬組成物は、従来、インターフェロンや抗体製剤に用いられてきた薬学的に許容しうるビヒクル、例えば、生理食塩水または5%デキストランを通常安定化剤や

賦形剤と一緒に含有することができる。

本発明の他の態様では、造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物と、インターフェロン α またはインターフェロン γ との併用療法に関する記載を含む指示書とからなるキットを提供する。

本発明の他の態様では、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する、造血器腫瘍を有する患者を治療するための医薬組成物であって、インターフェロン α またはインターフェロン γ と併用するための医薬組成物を提供する。

本発明の他の態様は、HM1.24抗原の発現は増強する、または誘導する物質をコードする遺伝子を投与することに関わる。例えば、インターフェロン α 、インターフェロン γ 、IRF-2のDNA配列は公知であり、所望のベクターに組み込んで患者に投与することができる。ベクターとしては、遺伝子治療に用いられるアデノウイルスベクター（例えばpAdexLew）やレトロウイルスベクター（例えばpZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivoであってもよいし、in vivoであってもよい。また、naked DNAを投与することも可能である。

実施例

実施例 1. インターフェロン α による骨髓腫細胞におけるHM1.24

抗原発現量の増強

ヒト骨髓腫細胞株U266（ATCC TIB 196）および多発性骨髓腫患者の骨髓由来の骨髓腫細胞を10%ウシ胎児血清（Whittaker Bioproducts, Inc, Walkersville, MD, USA）を含むRPMI1640培地（Sigma, St Louis, MO, USA）を用い、5%炭酸ガス培養器中、37℃で培養した。マウス抗HM1.24抗体を生産するハイブリドーマは、独立行政

法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託番号FERM BP-5233（寄託日1995年4月27日）として寄託されている。

骨髓腫細胞（ 1×10^5 /ml）を1000U/mlの天然型インターフェロノー α （大塚製薬、東京）存在下又は非存在下に48時間培養し、HM1.24抗原（それをコードする塩基配列を配列番号：1に示す）の変化をフローサイトメトリーで測定した。細胞を0.1%ウシ血清アルブミン（Sigma, St Louis, MO, USA）と0.02%アジ化ナトリウムを添加したリン酸緩衝液（Gibco BRL, Grand Island, NY, USA）で洗浄後、ヒト免疫グロブリン（3mg/ml、ミドリ十字、大阪）を加えたPBS（100 μ l）に浮遊させ、4℃で15分間、反応させた。

その後、2 μ lのFITC-ヒトIgG1（1mg/ml）又はFITC-抗HM1.24抗体（1mg/ml）を加え、4℃で60分間、染色した。患者骨髓腫細胞を用いた場合、骨髓腫細胞の同定には20 μ lのPE-anti-CD38（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）を加え、二重染色を行った。染色後、細胞をPBCで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド（和光純薬、大阪）を含むPBS中で保存した。その後、フローサイトメーター（EPICS XL, Coulter, Hialeah, FL, USA）を用い、HM1.24抗原の発現を解析した。

その結果、骨髓腫細胞株U266（図1）および患者骨髓腫細胞（図2）は無刺激の状態でHM1.24抗原を発現しており、インターフェロノー α の刺激により、HM1.24抗原の発現量はさらに増加した。

インターフェロノー α は骨髓腫細胞のHM1.24抗原の発現をさらに増強させ、骨髓腫細胞へ結合する抗HM1.24抗体の数を増加させた。抗HM1.24抗体による治療の抗腫瘍効果は、結合する抗体数に比例することから、骨髓腫患者において、インターフェロノー α を投与した後に抗HM1.24抗体治療を行うことは、抗体による治療効果を増強

し、より有効性を高める治療になると期待される。

実施例 2. レポーター遺伝子解析による HM1.24 抗原の発現機能の解析

抗原の発現誘導が HM1.24 プロモーター領域により調節されているかどうか調べるために、プロモーター領域でのレポーター遺伝子解析を行った。

HM1.24 プロモーター領域の遺伝子（配列番号：3）は PCR クローニングにより得た。ヒト末梢血単核細胞より DNAzol reagent（GIBCO）を用い、ゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA を鋳型として、プライマー HM2k（aaaggtaccagctgtcttttctgtctgtcc）（配列番号：4）、及び BST2B（atagtcatacgaagtagatgccatccag）（配列番号：5）を用い、TaKaRa Taq（宝酒造、大津）を用い Thermal Cycler 480（Perkin Elmer, CA, USA）にて PCR（94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min、30 cycles）を行った。

得られた約 2 kb の断片を制限酵素 KpnI 及び BglIII（宝酒造）にて処理し、レポータージーンプラスミド pGL3-basic（Promega, WI, USA）の KpnI-BglIII サイトに DNA ligation kit ver. II（宝酒造）を用いてクローニングし、コンピテント E. coli JM109（ニッポンジーン）を形質転換した。形質転換した大腸菌を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地にて 37℃ 培養し、QIAGEN plasmid maxi kit（QIAGEN, Hilden, Germany）にてプラスミドを調製した。

得られたプラスミド HM-2k/GL3 を制限酵素 KpnI 及び XhoI にて処理し、kilo-sequence 用 deletion kit（宝酒造）にて deletion clone を作製し、転写開始点上流 -493bp までを含むプラスミド HM-493/GL3 を得た。また HM-2k/GL3 を制限酵素 KpnI 及び AflIII にて処理し、上記方法にて deletion clone を作製し、転写開始点上流 -151bp 又は -77bp までを含む、それぞれ HM-151/GL3 及び HM-77/GL3 を得た。

細胞へのプラスミド導入はPolyethylenimine-Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit) (Bender MedSystems, Vienna, Austria)、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。細胞株を50 μ M Defferrioxamine、10% FBS を含むRPMI-1640 にて一晚培養した。導入するプラスミドをTf-PEIとの複合体にするため、終濃度20 μ g / mlのレポータージーンプラスミド、0.4 μ g / mlのpRL-SV40、1 μ g / ml Tf-PEI 試薬の混合液を作製し、室温で20分間インキュベートした。5 $\times 10^5$ 細胞 / mlの細胞をTf-PEI・プラスミド混合液の3倍容加え、4時間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートし、培地にて洗浄後、2 $\times 10^5$ 細胞 / mlの濃度で1 wellあたり100 μ l を96ウエル平底プレートで培養した。

IFN- α を終濃度0, 10, 100、又は1000U / mlとなるよう添加し、37 $^{\circ}$ C 2日間培養した。細胞をPBS(-)にて洗浄後、20 μ l のPassive Lysis Bufferにて溶解し、6 μ l をC96 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc) にアプライした。Luminoskan (Labsystems) にて基質液30 μ l、測定時間10秒にてFirefly 及びRenilaそれぞれの発光強度を測定した。測定値は、Firefly/Renilaにて補正後、コントロール (medium) を1として相対活性を求めた。

その結果、上流2 kbp 及び493bpともにIFN α 濃度依存的にレポーターのルシフェラーゼ活性が上昇しており、プロモーター領域の転写活性上昇が抗原の発現誘導を引き起こすことを確認した (図3)。

さらに、転写開始点上流151bp又は77bpのレポータープラスミドを用いた結果では、上流151bpのレポータープラスミドではIFN α 刺激によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方上流77bpのレポータープラスミドではIFN α 刺激による活性の変化は認められなかった (図4)。77~151bpの領域にはGAS element, ISRE に

相同性の高い配列が存在し、IFN α 刺激に応答して活性化する転写調節因子であることから、IRF ファミリーの転写調節因子が活性に関与していることが示された。

実施例 3. インターフェロン γ による骨髓腫細胞における HM1.24 抗原発現量の増強

実施例 1 に記載の方法により、1000U/ml の天然型インターフェロン γ (R & D System 社) を用いて解析した。その結果、骨髓腫細胞株 U266 (図 5) および患者骨髓腫細胞 (図 6) において、インターフェロン α と同様に、HM1.24 抗原の発現量の増大が観察された。

実施例 4. IRF-2 の HM1.24 プロモーター領域への結合

HM1.24 プロモーター領域に結合する転写因子を同定するために、HM1.24 プロモーター領域をプローブとした Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を次のように行い、結合因子として IRF-2 を同定した。

(1) 核抽出物の調製

骨髓腫細胞 U266-B1 (ATCC-TIB196) を 10% FBS (HyClone) を含む RPMI-1640 培地 (GIBCO-BRL) にて 37°C、5% CO₂ インキュベーター中で培養した。インターフェロン α (IFN- α) (Pepro Tech EC) による細胞への刺激を行うため、培地中に IFN- α を終濃度 1000U/ml となるように添加し、添加後 30 分、2 時間、4 時間及び 8 時間の細胞を回収した。細胞を冷 PBS(-) に懸濁し、1,000rpm にて遠心して上清を捨て、10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂ 溶液に懸濁した。

氷中に 5 分間静置後に再度遠心し、上清を捨てた。10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.4mM PMSF, 1mM Na₃VO₄ に細胞を懸濁した。ガラス製ホモジェナイザーを用いて細胞を氷上でホモジェナイズし、6000g 3 分間遠心し、上清を捨てた。抽出緩衝液 (20% グリセロール、20mM HEPES, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM E

DTA, 0.2mM PMSF, 1mM DTT, 0.1mM Na₃VO₄, 2 mg/ml アプロチニン、5mg/ml ロイペプチン) に細胞を懸濁し、氷中に20分間静置した。12000 g 10分間遠心し、上清を回収した。

(2) 標識プローブの調製

プローブとして、HM1.24プロモーター領域においてGAS (IFN- γ 活性化部位: GAS コンセンサス配列はttncnnnaa(配列番号: 8))、ISRE (IFN- α 刺激応答因子: ISREコンセンサス配列はngaaanngaactt(配列番号: 9))とホモロジーのある配列 (ttcccagaa(配列番号: 10) およびggaaactgaaact(配列番号: 11) を含むISRE2 を作製した。すなわち、オリゴDNA ISRE-F2 (aattttctgggaaactgaaactgaaaacct(配列番号: 12))及びISRE-R2 (aattaggttttcagtttcagtttcccaga(配列番号: 13))を混合し、アニールさせ2本鎖DNA プローブISRE2とした。

また、オリゴDNA adp-1 (catggcatctacttcgtatgactattgcagagtgc(配列番号: 14))及びadp-2 (catgggcactctgcaatagtcatacgaagtagatgc(配列番号: 15))を混合し、アニールさせunrelated プローブadpとした。プローブの標識はBand Shift Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、その標準プロトコールに準じて行った。すなわち、上記にて作製した2本鎖DNA50ng を [α -³²P]dATP (20 μ Ci)(Amersham Pharmacia Biotech) を含む反応液中でKlenow断片のポリメラーゼ反応を37°C、1時間行った。反応終了した溶液を2倍に希釈後Nick Spin Column (Amersham Pharmacia Biotech) にかけて、1600rpm、4分間遠心して回収した溶液を標識プローブとした。

(3) IFN- α による刺激により産生された結合因子の経時変化

Band Shift Kit (amersham pharmacia biotech, NJ, USA)の標準プロトコールに従って以下の操作を行った。前記(1)において経時的に調製した抽出物5 μ gにキット添付の10x 結合緩衝液(100m

M Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 5mMDTT) 2 μ l, 50%グリセロール 4 μ l, 1%NP-40 1 μ l、及び1 μ lのpoly(dI-dC)・poly(dI-dC)を加え、前記(2)で調製した 32 P 標識ISRE-2プローブ 2 μ lを添加し、水を加えて全量を20 μ lとした後、この反応混合物を室温にて20分間インキュベートし、前記抽出物中に存在する可能性のある結合因子と前記 32 P 標識ISRE-2プローブとの結合を許容した。

反応液18 μ lに10 \times 染色液 (Kit に添付) 2 μ lを加え、1 \times Tris-グリシン緩衝液 (25mM Tris, 190mMグリシン、1 mM EDTA, pH8.1) 中、7.5 %アクリルアミドゲル上で電気泳動し、電気泳動後、ゲルを濾紙にはりつけて蛋白質を濾紙に移行させた。ゲルドライヤーにて乾燥した濾紙をX線フィルムに感光させ、シグナルを検出した。

比較のため、抽出物を添加しない反応液[(NEC-)]、インターフェロン α により刺激しないで培養した細胞培養物からの抽出物を添加した反応液 [0h]、8時間の培養液の抽出物に標識プローブの代りに未標識ISRE2 プローブ50ngを添加した反応液 [8h (+cold)]、及び8時間の培養後の抽出液にunrelated プローブadp を50ng添加した反応液 [8 h (+cold unrelated)]を用意し、上記を同様に処理してシグナルの検出を行った。

結果を図7に示す。この図7から明らかな通り、HM1.24プロモーターの一部に相当する2本鎖DNA と結合する物質が、インターフェロン刺激下で培養したU266-B1 細胞中に経時的に増加した。

(4) 各種抗体との反応による転写因子の同定

前記(1)に記載したようにして、骨髓腫細胞U266-B1 (ATCC-TI B196) を1000U/mlのインターフェロン α の存在下で8時間培養し、抽出物を調製した。Band Shift Kit (Amercham Pharmacia Bio

tech) の標準プロトコールに従って次の操作を行った。すなわち、
5 μ g の抽出物に抗体 2 μ g を添加し、室温にて15分間インキュベ
ートし、抽出液／抗体反応液を得た。前記キット添付の10×結合緩
衝液 2 μ l、50%グリセロール 4 μ l、1% NP-40 1 μ l 及び 1
 μ l の Poly (dI-dC) · Poly (dI-dC) に、前記抽出液／抗体反応液
2 μ l 及び前記 (2) で調製した標識プローブ 2 μ l を添加し、水
を加えて全量を 20 μ l とした後、この反応混合物を室温にて20分間
インキュベートした。

この反応混合物を、前記 (3) に記載したようにして電気泳動に
かけ、シグナルの検出を行った。

上記の抗体として、次の抗体 (いずれも、Santa Cruz Biotechno
logyより) を使用した。

抗-ヒトSTAT1 p84/p91 (E-23) : (説明) ウサギポリクローナル
抗体 (SC-346X)

抗-ヒトSTAT2 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-476X)

抗-マウスSTAT3 (K-15) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-483X)

抗-ヒトISGF-3 γ p48 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-4
96X)

抗-ヒトIRF-1 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-497X)

抗-ヒトIRF-2 (C-19) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-498X)

抗-マウスICSAT (M-17) : ヤギポリクローナル抗体 (SC-6059X)

また、対照として、インターフェロンの刺激なしに培養した細胞
の抽出物を用いた反応液 [0h] ; 1000U/mlのインターフェロノー
 α 刺激下で8時間培養した細胞の抽出物を添加し、抗体を添加しな
い反応液 [8h] ; 標識ISRE2 プローブの代わりに未標識ISRE2 プロー
ブ50ngを添加した反応液 [8h(+cold)] ; 及び標識ISRE2 プローブの
代わりに未標識のdpプローブ50ngを添加した反応液 [8h(+unrelated

cold) を用意し、上記の同様に処理した。

結果を図 8 に示す。図 8 から明らかな通り、インターフェロナー α の刺激下で培養した細胞のからの抽出物中の標識 ISRE2 プローブと結合する成分は抗-IRF-2 抗体とのみ結合し、HM1.24プロモーターに結合してそれを活性化する因子は、転写因子 IRF-2 であることが示された。

実施例 5. IRF-2によるHM1.24プロモーター活性化の確認

IRF-2 共発現による HM1.24プロモーター活性への影響を U266細胞を用いたレポータージーンアッセイにより測定し、実際に IRF-2 が HM1.24プロモーターの転写活性化作用を持つことを明らかにした。以下の実験では、骨髓種細胞株 U266-B1(ATCC TIB196)を用いた。細胞は、10% FBS(GIBCO BRL)を含む RPMI-1640 培地(GIBCO)(以下 medium)により、5 % CO₂ incubator にて培養した。

(1) HM1.24プロモーター領域を含むプラスミドの構築

HM1.24プロモーター領域の遺伝子は PCR cloning により得た。ヒト末梢血単核細胞より DNAzol reagent(GIBCO) を用い、ゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA を鋳型として、プライマー HM2k (aaaggtaccagctgtcttttctgtctgtcc) (配列番号: 16)、BST2B (atagtcatacgaagtagatgccatccag) (配列番号: 17) を用い、TaKaRa Taq (宝酒造、大津) を用い Thermal Cyclor 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にて PCR (94°C 1 分間、55°C 1 分間、72°C 1 分間、30 サイクル) を行った。

得られた約 2 kb の断片を制限酵素 KpnI, BglII (宝酒造) にて処理し、レポータージーンプラスミド pGL3-basic (Promega, WI, USA) の KpnI, BglII サイトに DNA ligation kit ver. II (宝酒造) を用いてクローニングし、コンピテント E.coli JM109 (ニッポンジー) を形質転換した。形質転換した大腸菌を 100 μ g/ml のアンピシ

リンを含むLB培地にて37℃培養し、QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にてプラスミドを調製した。

得られたプラスミドHM-2k/GL3 を制限酵素KpnI, XhoIにて処理し、kilo-sequence 用deletion kit (宝酒造) にて欠失クローンを作製し、転写開始点上流-491bpまでを含むプラスミドHM-491/GL3を得た。またHM-2k/GL3 を制限酵素Kpn I, AflIIIにて処理し、上記方法にて欠失クローンを作製し、転写開始点上流-151bpまでを含むHM-151/GL3、を得た。

さらにHM-2k/GL3 を鋳型としてプライマー10S (tttcggtacctaataatcctctgcctg)(配列番号：18) およびGLプライマー2 (ctttatgttttggcgtcttcca) (配列番号：19) を用い、TaKaRa Taq (宝酒造、大津) を用いThermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA)にてPCR (94℃ 1分間、55℃ 1分間、72℃ 1分間、30サイクル) を行った。得られた断片を制限酵素KpnI, BglIII (宝酒造) にて処理し、レポータージーンプラスミドpGL3-basic (Promega, WI, USA) のKpnI, BglIII サイトにligation high (東洋紡) を用いてクローニングし、コンピテントE.coli JM109 (ニッポンジーン) をtransform した。

形質転換した大腸菌を100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地にて37℃培養し、QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にてプラスミドを調製した。こうして転写開始点上流125bpまでを含むHM-125/GL3を得た。またHM-2k/GL3 を鋳型としてプライマーHMP700 (aaaggtaccagagtttacctgggtatcctgg)(配列番号：20) およびGLプライマー2を用い、同様の手順にてPCR を行い、pGL3-basicのKpnI, BglIII サイトに断片を導入することにより、転写開始点上流約700bp までを含むHM-700/GL3を得た。

さらにHM-2k/GL3 を鋳型としてプライマーHMP700および11A' (ca

gaggattaattaggtaccgaaagagaggtgggctttt) (配列番号 : 21) を用い、KOD ポリメラーゼ (東洋紡) を用い Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にて PCR (98℃ 15秒、65℃ 2秒、74℃ 30秒、25サイクル) を行った。得られた断片を Zero Blunt TOP0 PCR cloning kit for sequencing ver.B (Invitrogen) を用いて、pCR4 Blunt-TOP0 vector に挿入した。得られたプラスミドを制限酵素 KpnI にて処理し、およそ 550bp の断片を回収し、HM-125/GL3 の KpnI サイトに ligation high を用いて導入した。こうして転写開始点上流 -125 ~ -145 付近を欠失した dISRE/GL3 を得た。

(2) IRF-2 発現プラスミドの構築

IRF-2 発現プラスミドは以下のように作製した。interferon- α (1000U/ml) にて刺激後 8 時間経過した U266 細胞より、TRIzol 試薬 (GIBCO-BRL) を用いて全 RNA を抽出した。First-strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用い、得られた RNA を鋳型、NotI-d(T)₁₈ をプライマーとして逆転写反応を 37℃ 1 時間行った。得られた cDNA を鋳型、IRF2-F2 (ttgtattggtacggtgaaaaaagc) (配列番号 : 22)、IRF2-R2 (cagctagttcacattatctcgtcc) (配列番号 : 23) をプライマーとして LA-Taq (宝酒造) を用いて PCR (94℃ 45秒、60℃ 45秒、72℃ 60秒、40サイクル) を行った。

得られた PCR 反応液を鋳型、IRF2-F1 (agagggtaccatgccggtggaaaggatgcg) (配列番号 : 24)、IRF2-R1 (agtcggtaccttaactgctcttgacgcggg) (配列番号 : 25) をプライマーとして KOD ポリメラーゼ (東洋紡) を用いて再度 PCR (94℃ 45秒、60℃ 45秒、72℃ 60秒、30サイクル) を行った。得られた断片を制限酵素 KpnI にて処理し、発現プラスミド pTracer-CMV (Invitrogen) の KpnI サイトに ligation high (東洋紡) を用いて導入し、IRF-2 発現プラスミド pIRF-2/Tracer を得た。

(3) レポーター遺伝子活性の測定

細胞へのプラスミド導入はPolyethylenimine-Transferrin Infection Kit (Tf PEI-Kit)(Bender MedSystems, Vienna, Austria)を、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いた。細胞株を50 μ M Deferrioxamine, 10 % FBSを含むRPMI-1640にて一晩培養した。導入するプラスミドをTf-PEIとの複合体にするため、終濃度20 μ g/mlのレポータージーンプラスミド、20 μ g/mlのpIRF-2/Tracer またはpTracer-CMV, 0.4 μ g/mlのpRL-SV40, 1 μ g/ml Tf-PEI reagent の混合液を作製し、室温で20分間インキュベートした。

5 $\times 10^5$ 細胞/mlの細胞をTf-PEI plasmid混合液の3倍容加え、4時間37°Cにてインキュベートし、培地にて洗浄後、2 $\times 10^5$ 細胞/mlの濃度で1ウェルあたり100 μ lを96ウェル平底プレートで培養した。IFN- α を終濃度0, 1000U/mlとなるよう添加し、37°C 2日間培養した。細胞をPBS(-)にて洗浄後、20 μ lのPassive Lysis Bufferにて溶解し、6 μ lをC96 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc)にアプライした。Luminoskan (Labsystems)にて基質液30 μ l、測定時間10秒にてFirefly, Renilaそれぞれの発光強度を測定した。測定値はFirefly/Renilaにてトランスフェクション効率の補正を行い相対活性を求めた。

(4) 結果

HM1.24プロモーターレポータープラスミドとIRF-2 発現プラスミドをU266細胞に導入し、レポーター活性を測定した(図9)。その結果、IRF-2 結合サイトであるISREモチーフ配列を含む-700および-151で、IRF-2 共発現によりルシフェラーゼ活性が上昇した。一方ISRE配列を欠失したdISRE/GL3 ではIRF-2 共発現によるルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった。以上の結果よりIRF-2 はHM

1. 24プロモーターのISRE領域に結合し、その転写活性を増強することが示された。

(5) IRF-2 の強制発現によるHM1.24抗原の発現増強の確認

IRF-2 によるHM1.24抗原の発現量の変化は、IRF-2 発現プラスミド (pIRF-2/Tracer) またはコントロールプラスミド (pTracer/CMV) をU266細胞に上記方法にて導入し、1～2日間培養した後、細胞を回収し、一次抗体としてマウス抗ヒトHM1.24抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体により染色する。細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞のFITC蛍光強度を測定する。IRF-2 発現プラスミド導入細胞では、コントロールプラスミド導入細胞に比較してFITC強度の高い細胞が多く存在することを確認する。

実施例 6. インターフェロン α によるリンパ系腫瘍細胞における
HM1.24抗原発現量の増強、および骨髓性白血病細胞に
おけるHM1.24抗原の発現誘導

ヒト骨髓性白血病細胞株HEL (Japanese Cancer Research Resources, Tokyo, Japan) および造血器腫瘍患者の骨髓やリンパ節由来の腫瘍細胞は、実施例1に記載の方法で培養した。また、インターフェロン α は実施例1と同一のものをを用い、インターフェロン α による刺激方法およびフローサイトメトリーの測定方法も実施例1と同様におこなった。尚、FITC-抗HM1.24抗体として、FITC-ヒト型化抗HM1.24抗体 (1 mg/ml) を使用した (国際特許公開番号W098/14580参照、軽鎖および重鎖可変領域のバージョンはRVLaおよびRVHs)。また、骨髓性白血病細胞の同定にはPE-抗CD33抗体、B細胞性リンパ腫の同定にはPE-抗CD19抗体、T細胞性リンパ腫の同定にはPE-抗CD4抗体 (全てPharmingen, San Diego, CA, USA) を20 μ l 加え、二重染色を行った。

その結果、IFN- α 非刺激下では、HEL および急性骨髄性白血病患者由来の腫瘍細胞では、HM1.24抗原の細胞表面上への発現は、殆ど認められないか、非常にわずかししか認められず、これらの腫瘍細胞では、IFN- α 非刺激下ではHM1.24抗原の発現は実質的に認められなかった。一方、急性リンパ球性白血病、B細胞性非ホジキンリンパ腫、T細胞性非ホジキンリンパ腫患者由来の腫瘍細胞では、IFN- α 非刺激下においてもHM1.24抗原の細胞表面上での発現が認められた。これに対し、IFN- α で刺激した場合、HEL および急性骨髄性白血病患者由来の腫瘍細胞ではHM1.24抗原の発現が誘導された。

実質的にHM1.24抗原を発現していないこれらの細胞においても、IFN- α はHM1.24抗原を発現させることができた。また、急性リンパ球性白血病、B細胞性非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫患者由来の腫瘍細胞においても、HM1.24抗原の発現量が増大した。これら5種の腫瘍細胞において、IFN- α 刺激によって発現したHM1.24抗原の量はほぼ同程度であった。これらの結果は、IFN- α が造血器腫瘍細胞全般に対して、HM1.24抗原の発現誘導作用または発現増強作用を有することを示す。

実施例7. インターフェロン α による抗HM1.24抗体のADCC活性の増強

ヒト骨髄性白血病細胞株HEL を標的細胞として用いた。HEL (1×10^6 cells) に0.1mCiの ^{51}Cr -sodium chromate (New England Nuclear, Boston, MA, USA) を加え、37°Cで1時間放置した。その後、RPMI1640で3回洗浄し、 1×10^4 個を円底96ウェルプレート (Corning) に分注した。

種々の濃度のヒト型化抗HM1.24抗体 (国際特許公開番号W098/14580参照、軽鎖および重鎖可変領域のバージョンはRVLaおよびRVHs) を加えた後、エフェクター細胞として、健常人の末梢血単核球 ($5 \times$

10⁵個)を加え、37℃で4時間放置した。培養上清中の放射活性をガンマカウンターで測定し、ADCCによる細胞傷害活性を以下の計算式により求めた。尚、最大値は、標的細胞に1%NP40を加えることで細胞を破壊して測定した。また、最小値は、培養液であるRPMI1640のみを添加して測定した。

$$\text{ADCC活性 (\%)} = (\text{測定値} - \text{最小値}) / (\text{最大値} - \text{最小値})$$

その結果、IFN- α による刺激を行わない場合には、いずれのヒト型化抗HM1.24抗体濃度においても顕著なADCC活性は認められなかったが、IFN- α で刺激した場合には、ヒト型化抗HM1.24抗体による顕著なADCC活性が認められた。また、ADCC活性は抗体濃度依存性であり、細胞表面上のHM1.24抗原の発現によってADCC活性が誘導されたことが示された。

この結果は、IFN- α 等の刺激により腫瘍細胞表面上のHM1.24抗原の発現量が上昇すれば、抗HM1.24抗体による細胞傷害活性、すなわち抗腫瘍効果が増強されることを示しており、IFN- α 等のHM1.24抗原発現増強剤と抗HM1.24抗体を併用することで、より少量の抗HM1.24抗体使用量で同等の効果を期待できることを示す。また、抗HM1.24抗体単独では顕著な効果が期待できない造血器腫瘍細胞においても、IFN- α 等の発現誘導剤と抗HM1.24抗体との併用により、抗腫瘍効果が期待できることを示す。

請 求 の 範 囲

1. インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質を有効成分とする、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の造血器腫瘍細胞における発現増強剤または発現誘導剤。

2. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髄腫である請求項1 から4 のいずれか1 項に記載の発現増強剤または発現誘導剤。

3. 前記白血病が急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項2 に記載の発現増強剤または発現誘導剤。

4. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫またはB細胞性非ホジキンリンパ腫である請求項2 に記載の発現増強剤または発現誘導剤。

5. 前記骨髄腫が多発性骨髄腫である請求項2 に記載の発現増強剤または発現誘導剤。

6. 有効成分として、（1）インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質、および（2）配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体、を含んでなる造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

7. インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質と併用することを特徴とし、有効成分として配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を含んでなる造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

8. 配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体と併用することを特徴とし、有効成分として、イ

インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質を含む造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

9. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髄腫である請求項6から8のいずれか1項に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

10. 前記白血病が急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項9に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

11. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞系非ホジキンリンパ腫またはB細胞系ホジキンリンパ腫である請求項9に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

12. 前記骨髄腫が多発性骨髄腫である請求項9に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

13. 前記抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項6から8のいずれか1項に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

14. 前記細胞傷害活性がADCC活性である請求項13に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

15. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項6から14のいずれか1項に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

16. 前記抗体がキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である請求項15に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

17. 前記抗体が寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体である請求項15に記載の造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物。

18. 前記キメラ抗体またはヒト型化抗体が、寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体のキメラ抗体またはヒト型化抗体である請求項16に記載の造血器腫瘍の治療

剤または医薬組成物。

19. 造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、

(1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体；および

(2) 上記抗体を、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤と組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキット。

20. 造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、

(1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤；および

(2) 上記薬剤を、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキット。

21. 造血器腫瘍を有する患者を治療するためのキットであって、

(1) 配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤；

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体；および

(3) 上記薬剤および抗体を組み合わせて患者に投与することを指示する指示書；

を含むキット。

22. HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングする方法であって、

(1) HM1.24遺伝子プロモーター領域を有するレポーター遺伝子を有する細胞を調製する工程；

(2) 前記細胞に被験物質を接触させる工程；並びに

(3) レポーター遺伝子の発現を検出する工程、を含む方法。

23. 請求項22に記載の方法によって選択されるHM1.24抗原の発現増強剤。

24. 請求項23に記載の発現増強剤を含み、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを特徴とする造血器腫瘍治療用医薬組成物。

25. IRF-2 タンパク質の発現を増強する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(1) 細胞と被験物質とを接触させる工程；並びに

(2) 前記細胞のIRF-2蛋白の発現量を測定する工程、を含む方法。

26. 請求項25に記載の方法によって選択されるIRF-2タンパク質の発現増強剤。

27. 請求項26に記載の発現増強剤を含み、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを特徴とする造血器腫瘍治療用医薬組成物。

28. 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の造血器腫瘍細胞における発現増強剤または発現誘導剤の製造のためのインターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2蛋白質使用。

29. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髓腫である請求項28に記載の使用。

30. 前記白血病が急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項29に記載の使用。

31. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫ま

たはB細胞性非ホジキンリンパ腫である請求項29に記載の使用。

32. 前記骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項29に記載の使用。

33. 造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物の製造のための、(1) インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質、および(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体の使用。

34. インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質と併用される造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物の製造のための、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体の組合せ使用。

35. 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体と併用される、造血器腫瘍の治療剤または医薬組成物の製造のためのインターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2 蛋白質の使用。

36. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髓腫である請求項33から35のいずれか1項に記載の使用。

37. 前記白血病が急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項36に記載の使用。

38. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞系非ホジキンリンパ腫またはB細胞系ホジキンリンパ腫である請求項36に記載の使用。

39. 前記骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項36に記載の使用。

40. 前記抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項33から35のいずれか1項に記載の使用。

41. 前記細胞傷害活性がADCC活性である請求項40に記載の使用。

42. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項33から41のいずれか1項に記載の使用。

43. 前記抗体がキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である請求項42に記載の使用。

44. 前記抗体が寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体である請求項45に記載の使用。

45. 前記キメラ抗体またはヒト型化抗体が、寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体のキメラ抗体またはヒト型化抗体である請求項43に記載の使用。

46. 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用する造血器腫瘍治療用医薬組成物の製造のための、請求項23に記載の発現増強剤の使用。

47. 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用する造血器腫瘍治療用医薬組成物の製造のための請求項26に記載の発現増強剤の使用。

48. 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の造血器腫瘍細胞における発現増強または発現誘の方法において、インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2蛋白質を投与することを含んで成る方法。

49. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髓腫である請求項48に記載の方法。

50. 前記白血病が急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項49に記載の方法。

51. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫またはB細胞性非ホジキンリンパ腫である請求項49に記載の方法。

52. 前記骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項49に記載の方法。

53. 造血器腫瘍の治療方法において、（1）インターフェロン α 、インターフェロン γ またはIRF-2蛋白質、および（2）配列番号

： 2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する抗体を投与することを含んで成る方法。

54. 前記造血器腫瘍が、白血病、リンパ腫または骨髄腫である請求項53に記載の方法。

55. 前記白血病が急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である請求項53に記載の方法。

56. 前記リンパ腫がホジキン病、T細胞系非ホジキンリンパ腫またはB細胞系ホジキンリンパ腫である請求項53に記載の方法。

57. 前記骨髄腫が多発性骨髄腫である請求項53に記載の方法。

58. 前記抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項53に記載の方法。

59. 前記細胞傷害活性がADCC活性である請求項58に記載の方法。

60. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項53から59のいずれか1項に記載の方法。

61. 前記抗体がキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である請求項60に記載の方法。

62. 前記抗体が寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体である請求項60に記載の方法。

63. 前記キメラ抗体またはヒト型化抗体が、寄託番号FERM BP-5233であるハイブリドーマによって産生される抗HM1.24抗体のキメラ抗体またはヒト型化抗体である請求項61に記載の方法。

64. 造血器腫瘍の治療用方法において、請求項23に記載の発現増強剤と、配列番号： 2 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを含んで成る方法。

65. 造血器腫瘍の治療方法において、請求項26に記載の発現増強

剤と、配列番号：２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体と組み合わせて使用することを含んで成る方法。

Fig.1

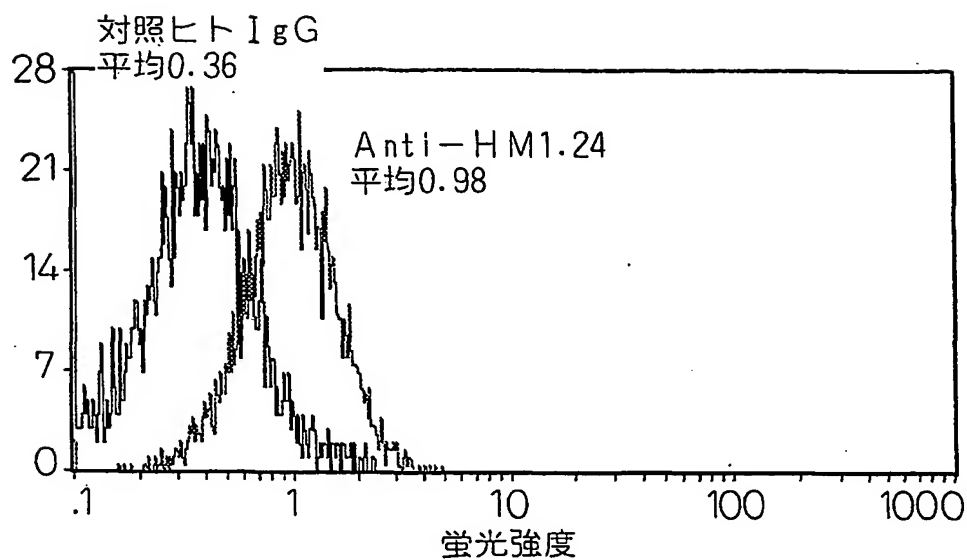
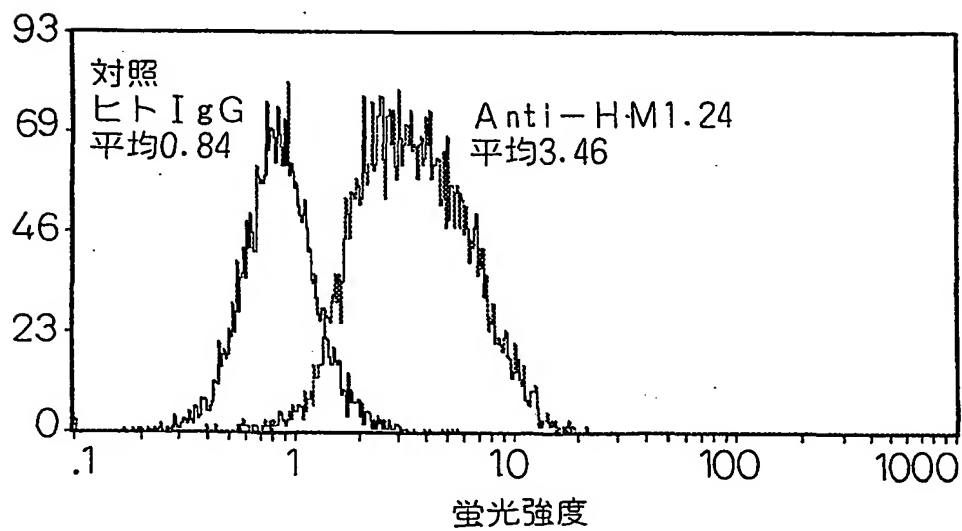
インターフェロナー α (－)インターフェロナー α (+)

Fig.2

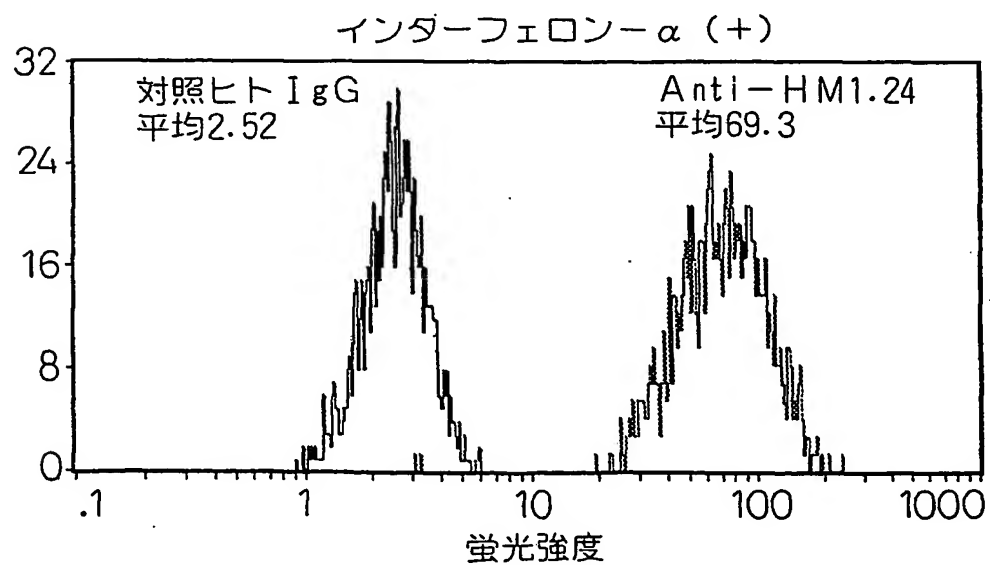
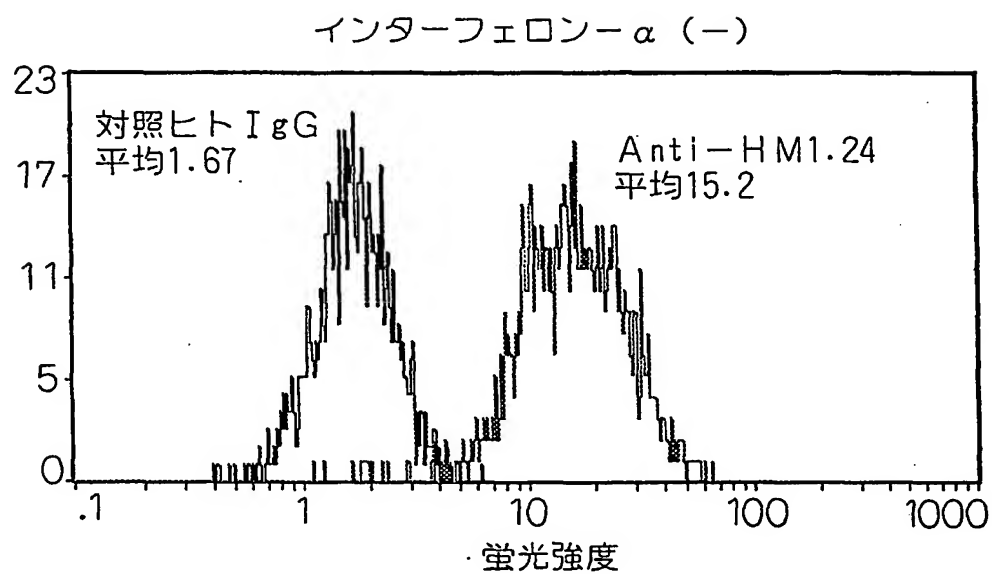


Fig.3

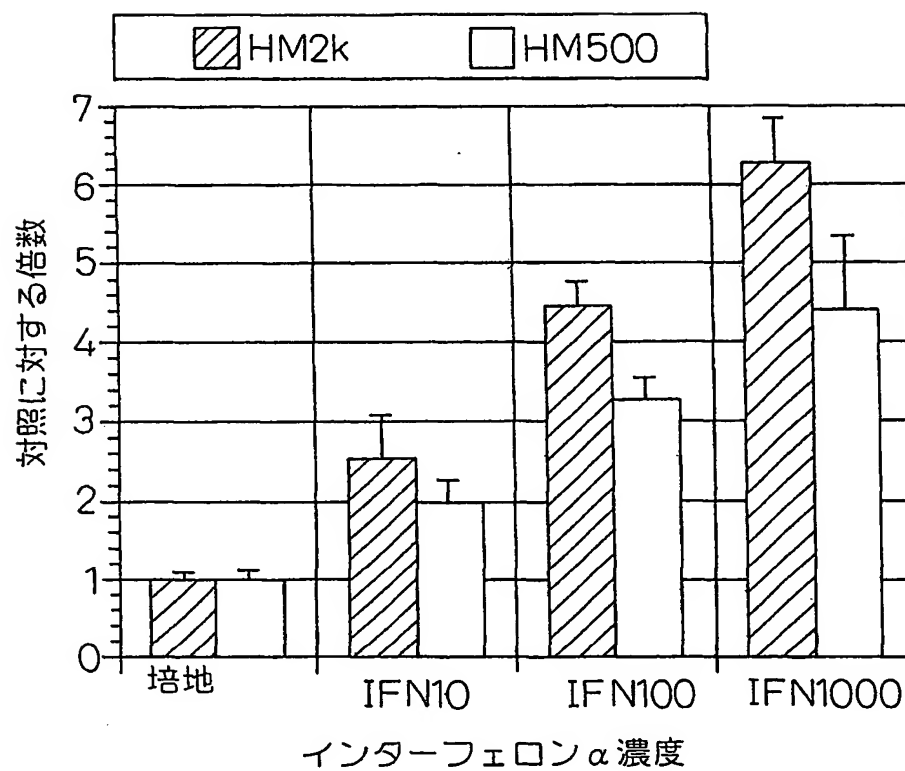


Fig.4

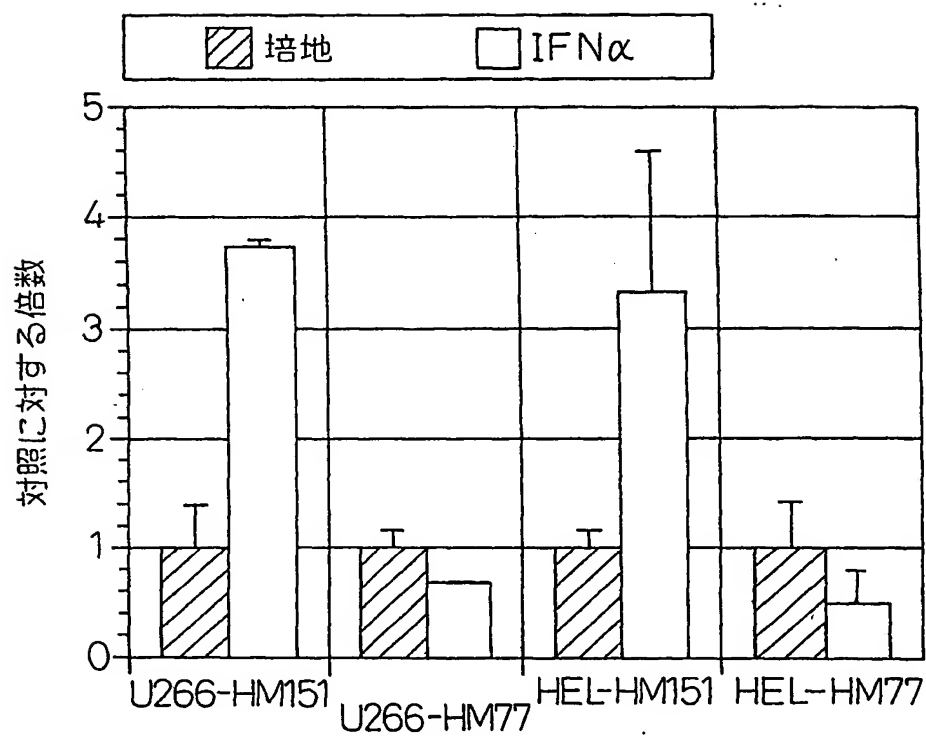


Fig.5

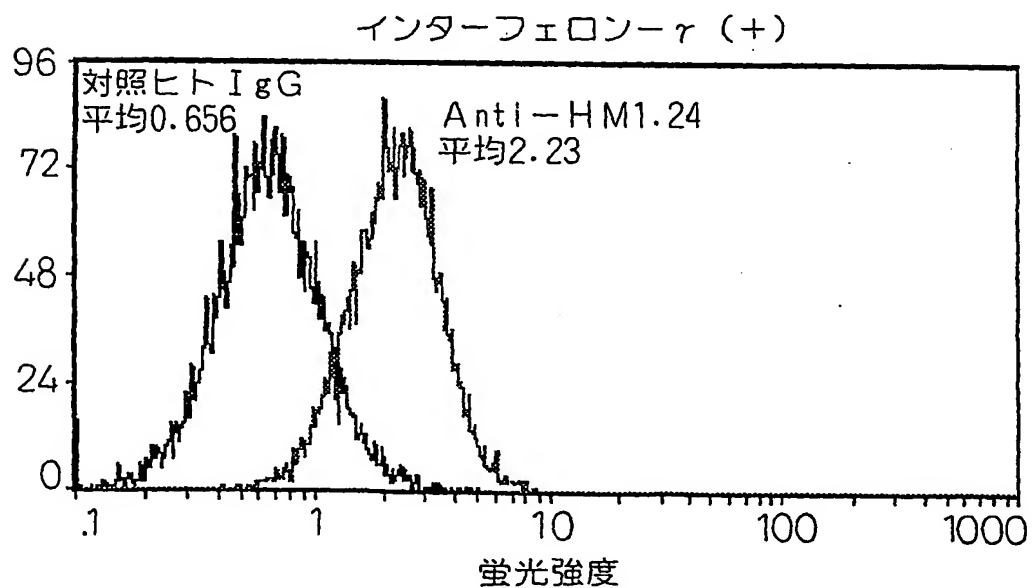
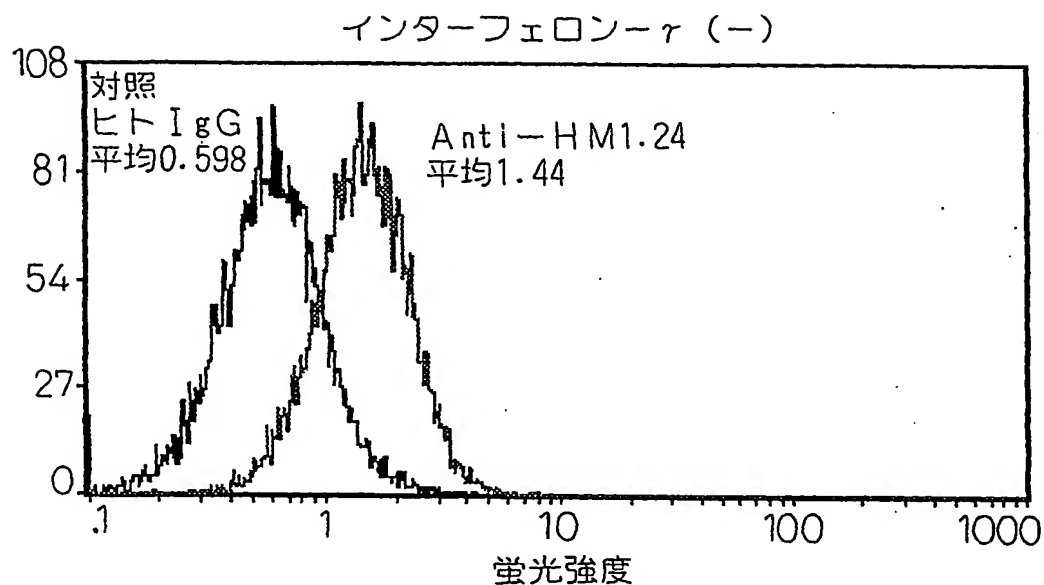


Fig.6

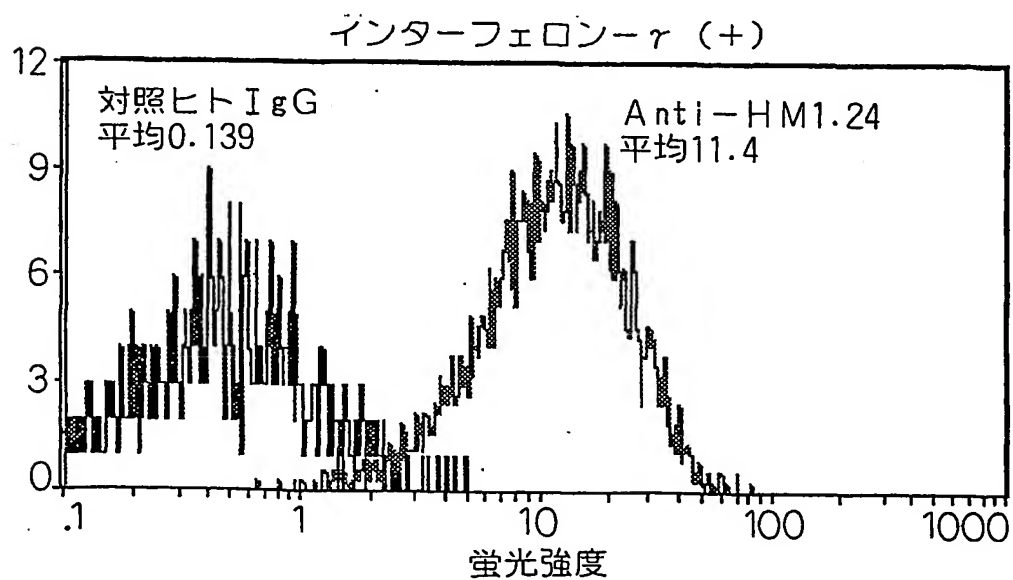
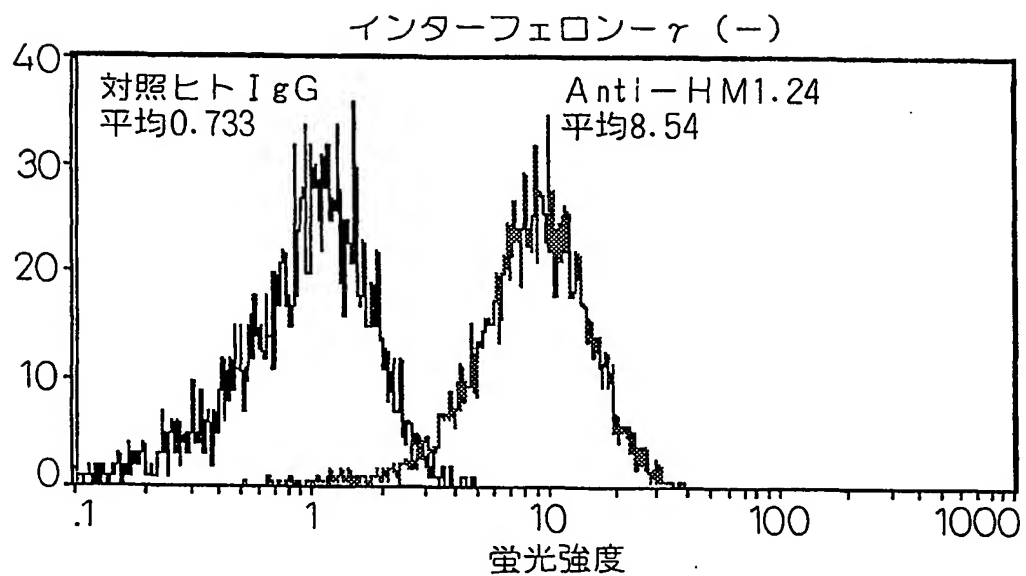


Fig.7

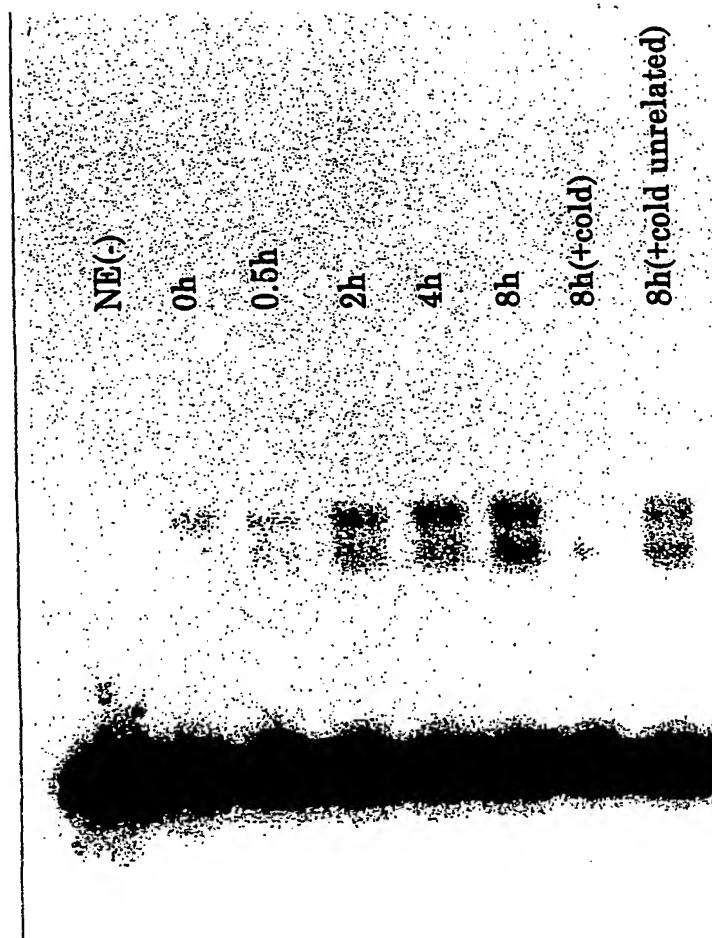


Fig.8

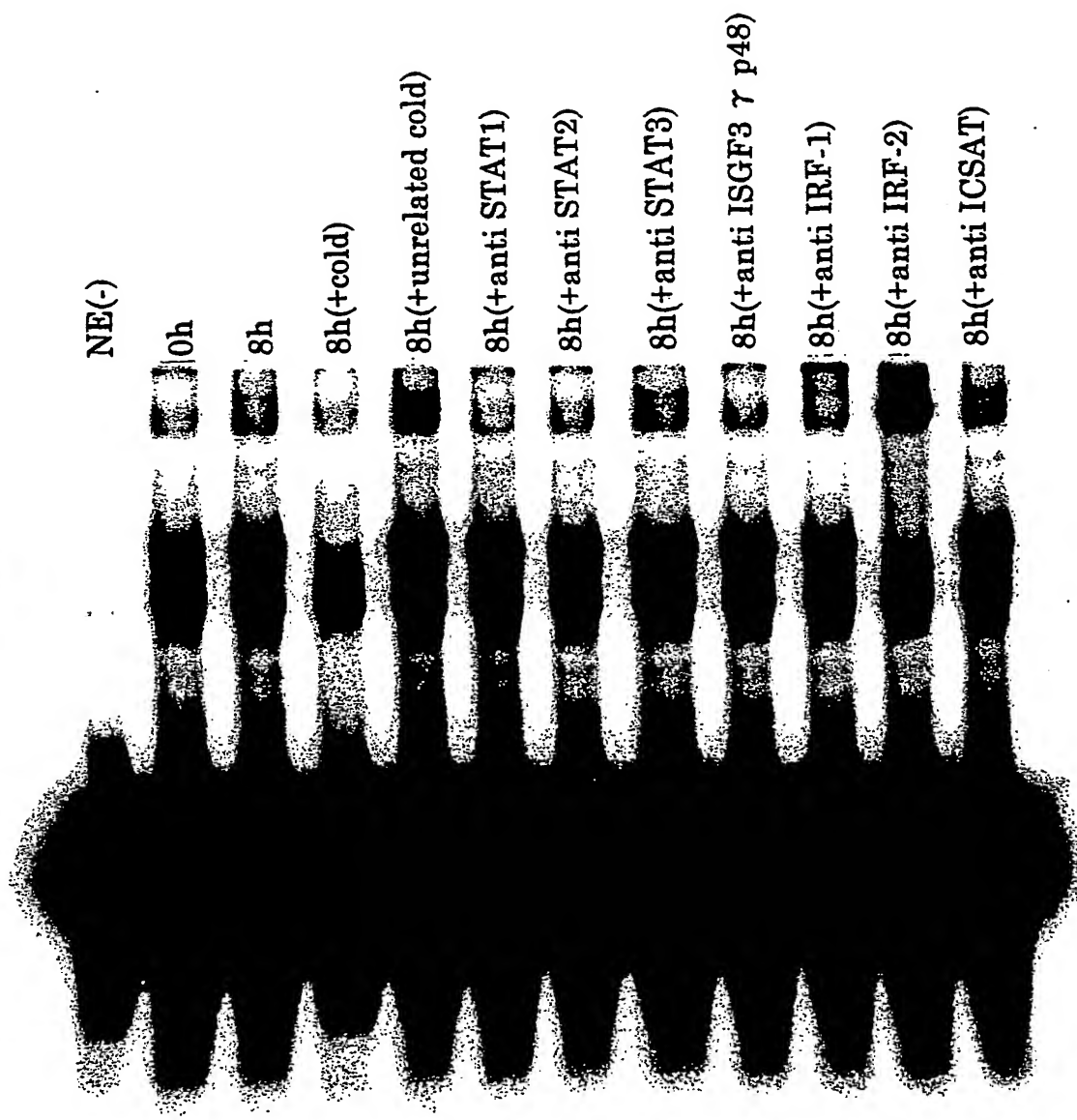


Fig.9

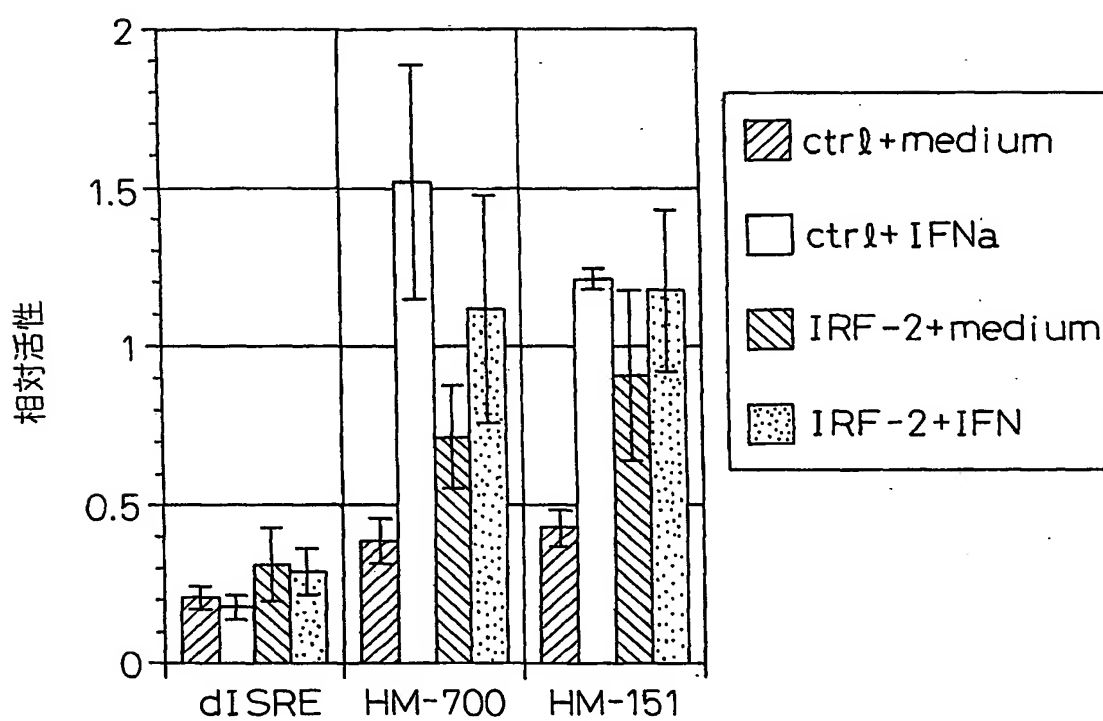


Fig.10

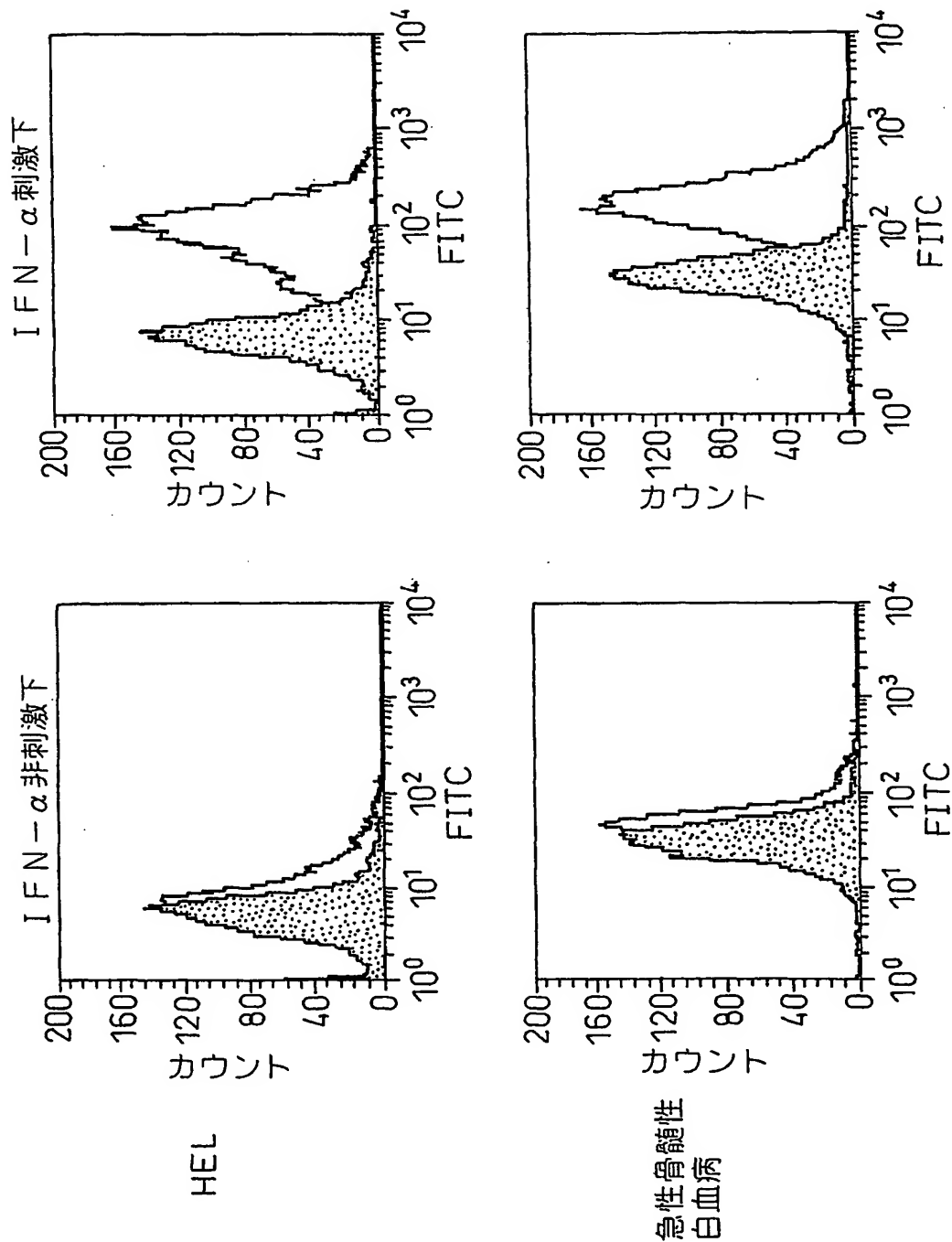


Fig.11

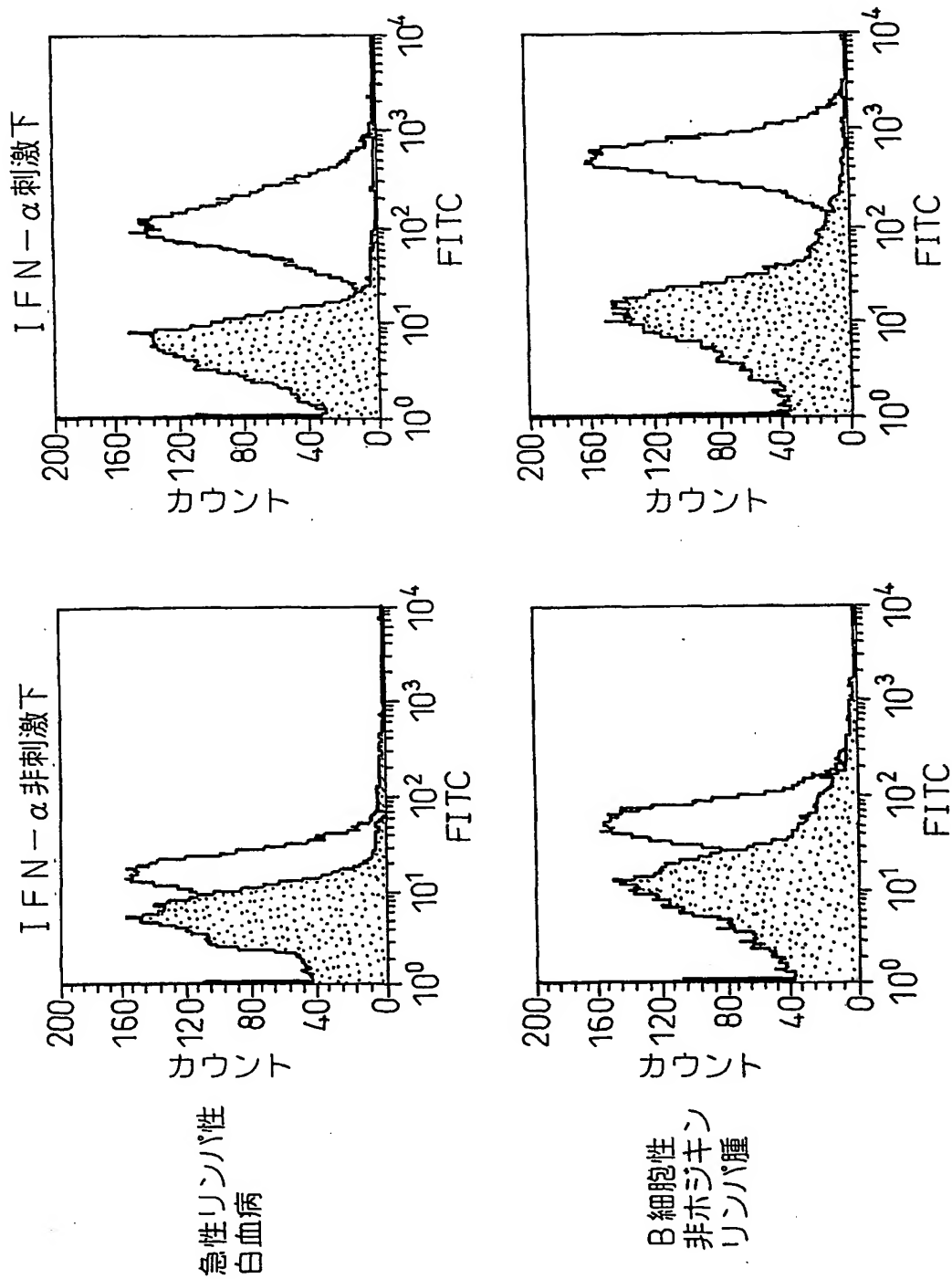


Fig.12

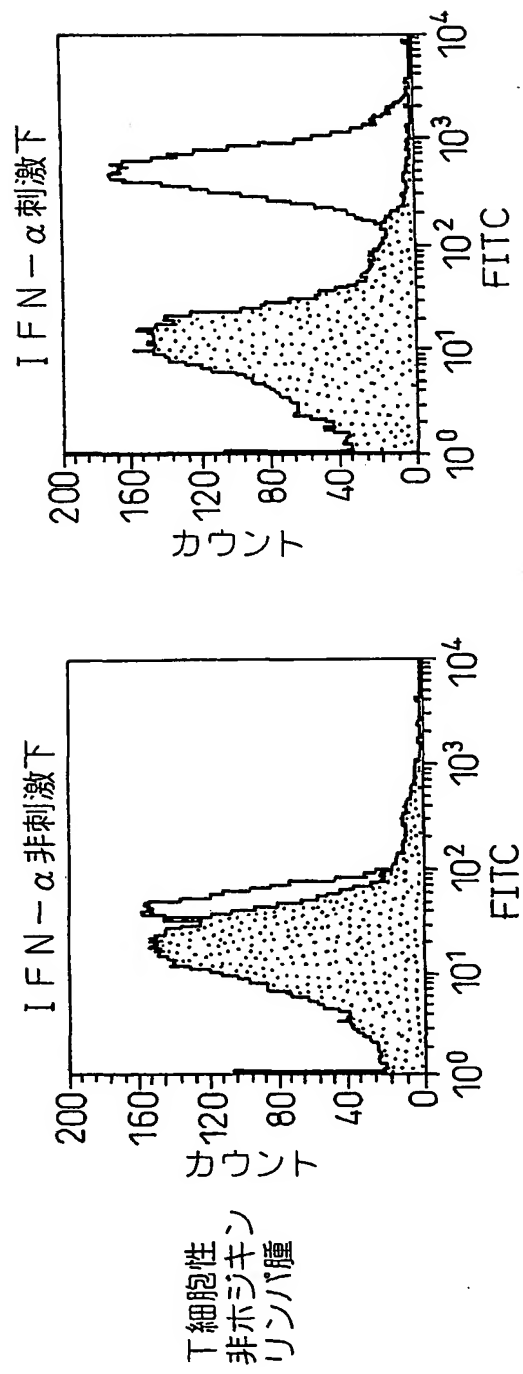
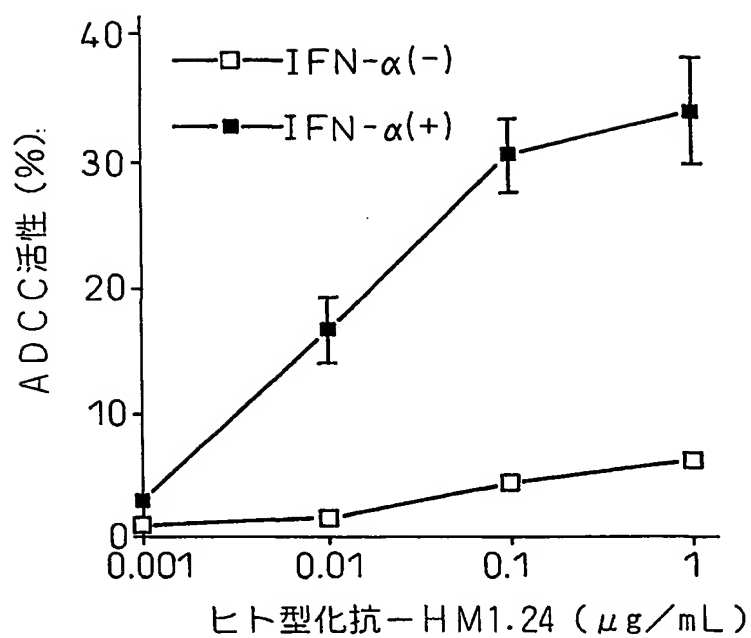


Fig.13



SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
 < 1 2 0 > Therapeutic agent for hematopoietic organ tumors
 < 1 3 0 > H757
 < 1 6 0 > 5
 < 2 1 0 > 1
 < 2 1 1 > 1073
 < 2 1 2 > DNA
 < 2 1 3 > Homosapiens
 < 2 2 3 > Nucleotide sequence coding for Hm1.24 protein antigen
 < 4 0 0 > 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	
ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	

acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
 90 95 100 105
 aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
 110 115 120
 aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
 125 130 135
 aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
 140 145 150
 tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
 155 160 165
 att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatccagga 575
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
 170 175 180
 agctggcaca tcttgaagg tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
 tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
 gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac 755
 agtcgggttg acccagggt gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815
 tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt 875
 tgttatgggt tttttttgcg ggggggggtt cttttttctg ggggtctttga gctccaaaaa 935
 aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
 aaaattcggg cggccgcc 1013

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 180

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
 20 25 30
 Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
 35 40 45
 Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
 50 55 60
 Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
 85 90 95
 Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
 100 105 110
 Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
 115 120 125
 Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
 130 135 140
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
 165 170 175
 Ala Leu Leu Gln
 180

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2016

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene coding for HM
1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 3

```

actaaaagtc tctgatatgc agaaataatg gcataagctg tctttctgtc tgtccctctc 60
ctctctctct gcctcggctg ccaggcaggg aagggccccc tgtccagtgg acacgtgacc 120
cacatgacct tacctatcat tggagatgac tcacactctt taccctgccc cttttgcttt 180
gatatcaata aataacagca cagccagaca ttcggggcca ctaccagtct ccgcgcattg 240
ctggtagtgg tccccgggc ccagctgtct tttcttttat ctcttcgtct tgtgtcttta 300
tttctacact ctctcgtcgc cgcacacagg gagagaccca ctgaccctgt ggggctggtc 360
cctacagtaa ttttaaaggg aagagcaaca aactttcggt ttgcagggtt gggactgttt 420
acagctgcaa aatttagaga ggacatcaat ctattattat ccacatttta cagctgggga 480
aatcaatgct aagagaggaa attcatttgc ccagagggtc accaccctgg cctccaatgt 540
gcaattcatg caattgtgat ttccgacctg gtcccaaact aaccctaaag ttagcaggcc 600
agaacagtgc tgctcaaata agtcagctta gtcaaataag tcaggcaaag gtcgtgtctt 660
tgcacctgga gtcctggcca ggctggtagg tccctcctcc tgggacaagt tcaccctcag 720
aattttcagc aagatcatct cccacagctt gttaatttgt tcttggttct aagtgatatt 780
tttgtttatt ggtttaagag atgggatccc actctatcac ccaggcttga gtgccgtggc 840
acaatcatag ctgctgcag cctcaaactc ctgggctcga gtgatcctcc tgcctcagcc 900
tcccagcctc agcctgggac cacaggcatg taccaccatg cctggctcta agtggcttta 960
atggggtcct tctgagggat gttggagtca gggcctgggg ggagttcccc aggccttctg 1020
ggaggcctgg gctctggact tgacctgcc tactgtctgg cctgtctgaa aagaaaaaaaa 1080
aacatggaaa tggcagacct aacagaatct gggctgttgt caggatgtgg ctgaagaagc 1140
cacaagaaaa acatgcagtc ccctttcagc ggtcatgccc agcagttggg tgccgataat 1200
gggcctgatt tcctgtagga agccctggct ctcttggcca catggacagt gtctgaggct 1260
ggccctgtta ttcccctttg cagatgaaga aacaggctca gagagtttac ctggtatcct 1320
ggagtcccag gagcactttt tctggaagta ggagcttgtt tcctgcaggt gccaagacag 1380
agaccgacat tgtttgttgg ctgggtcggt ctcccagttt tcagctggct ccagtctcac 1440

```

ctgttgctca cacaccctcc atgtctccca tagtcccctc ggtggggaca gaggcactgg 1500
 atgaagccct gctcgtcacc acagagacac ctgaacacaa aaaccagtcc ctggggtcag 1560
 acccaggccc cgccccaga cccaggccct gccctcactc caccacgcaa ctgtgcaacc 1620
 tcagtttccc caggtggaga ccggaccaac aatgatggcc tctgcctctt caggtcatag 1680
 tacagatgaa tacaggctgg cacggcctag gcactcagta acacacggca gaggcacagg 1740
 gacttaagat ggagtgtccc aggcagccac agttggctgg caccagttg ggaagggcc 1800
 aagggtttt aaagcagggt gaaaaaaaaa gccacacctc tttctgggaa actgaaactg 1860
 aaaacctaataaatcctctg cctgtagggt cctcatgcaa gagctgctgg tcagagcact 1920
 tcctggaact tgctattggt caggacgttt cctatgctaa taaaggggtg gcccgtagaa 1980
 gattccagca cctccccta actccaggcc agactccttt cagctaaagg ggagatctgg 2040
 atg gca tct act tcg tat gac 2061
 Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp

5

< 2 1 0 > 4
 < 2 1 1 > 29
 < 2 1 2 > DNA
 < 2 1 3 > Artificial Sequence
 < 2 2 0 >
 < 2 2 1 >
 < 2 2 2 >
 < 2 2 3 > Primer HM2K
 < 4 0 0 > 4

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

< 2 1 0 > 5
 < 2 1 1 > 78
 < 2 1 2 > DNA
 < 2 1 3 > Artificial Sequence
 < 2 2 0 >
 < 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer BST2B

< 4 0 0 > 5

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 2144

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence coding for IRF-2 protein

< 4 0 0 > 6

```

aactgacggg ctttcatttc catttcacac accctagcaa cacttatacc ttgcggaatt 60
gtattggtag cgtgaaaaaa gcacactgag agggcaccat gccggtggaa aggatgcgca 120
tgcgcccgtg gctggaggag cagataaact ccaacacgat cccggggctc aagtggctta 180
acaaggaaaa gaagatTTTT cagatcccct ggatgcatgc ggctagacat gggtaggatg 240
tggaaaaaga tgcaccactc tttagaaacc gggcaatcca tacaggaaag catcaaccag 300
gagtagataa acctgatccc aaaacatgga aggcgaattt cagatgcgcc atgaattcct 360
tgcctgatat tgaagaagtc aaggataaaa gcataaagaa aggaaataat gccttcaggg 420
tctaccgaat gctgccccta tcagaacggc cttctaagaa aggaaagaaa ccaaagacag 480
aaaaagaaga caaagttaag cacatcaagc aagaaccagt tgagtcatct ctggggctta 540
gtaatggagt aagtgatctt tctcctgagt atgcggtcct gacttcaact ataaaaaatg 600
aagtggatag tacggtgaac atcatagttg taggacagtc ccatctggac agcaacattg 660
agaatcaaga gattgtcacc aatccgccag acatttgcca agttgtagag gtgaccactg 720
agagcgacga gcagccggtc agcatgagcg agctctaccc tctgcagatc tccccgtgt 780
cttcctatgc agaaagcgaa acgactgata gtgtgcccag cgatgaagag agtgccgagg 840
ggcggccaca ctggcggaag aggaatattg aaggcaaaca gtacctcagc aacatgggga 900
ctcgaggctc ctacctgctg cccggcatgg cgtccttcgt cacttccaac aaaccggacc 960
tccaggtcac catcaaagag gagagcaatc cgggtgcctta caacagctcc tggccccctt 1020
ttcaagacct ccccccttct tcctccatga cccagcattc cagcagcagt cggccagacc 1080
gggagaccgg ggccagcgtc atcaagaaaa catcgatat caccagggcc cgcgtcaaga 1140

```


gctgttaagc ctctgactct ccgcggtggt tgttggggct tcttggcttt gttttgttgt 1200
 ttgtttgtat tttatTTTT tctctctgac acctatttta gacaaatcta agggaaaaag 1260
 ccttgacaat agaacattga ttgctgtgtc caactccagt acctggagct tctctttaac 1320
 tcaggactcc agcccatggt tagacgtgtg tttctagagc ctgctggatc tcccagggt 1380
 actcactcaa gttcaaggac caacaagggc agtggagggt ctgcattgcc tgcggtcaag 1440
 gccagcaagg tggagtggat gcctcagaac ggacgagata atgtgaacta gctggaattt 1500
 tttattcttg tgaatatgta cataggcagc actagcgaca ttgcagtctg cttctgcacc 1560
 ttatcttaaa gcacttacag ataggccttc ttgtgatctt gctctatctc acagcacact 1620
 cagcaccccc ttctctgccc attccccagc ctctcttctt atcccatccc atcccatccc 1680
 atcccatccc atcccatccc gctcttttcc tacttttctt tccctcaaag cttccattcc 1740
 acatccggag gagaagaagg aaatgaattt ctctacagat gtcccatttt cagactgctt 1800
 taaaaaaaa ctttctaata tgctatgctt gaatgccacg cggtacaaag gaaaaagtat 1860
 catggaaata ttatgcaaat tcccagattt gaagacaaaa atactctaata tctaaccaga 1920
 gcaagctttt ttatTTTTta tacaggggaa tatTTTattc aaggtaaaat tctaaataaa 1980
 atataattgt TTTTtatctt ttctacagca aatttataat ttttaagattc cttttcttgt 2040
 ttatcagcag ttgttattac atccttgtgg cacattTTTT ttttaatttg taaaggtgaa 2100
 aaaagctttt atgagctcat ctagcaatca gattttcctg tgga 2144

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 349

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of IRF-2 protein

< 4 0 0 > 7

Met Pro Val Glu Arg Met Arg Met Arg Pro Trp Leu Glu Glu Gln Ile

1 5 10 15

Asn Ser Asn Thr Ile Pro Gly Leu Lys Trp Leu Asn Lys Glu Lys Lys

20 25 30

Ile Phe Gln Ile Pro Trp Met His Ala Ala Arg His Gly Trp Asp Val

35 40 45

Glu Lys Asp Ala Pro Leu Phe Arg Asn Arg Ala Ile His Thr Gly Lys
 50 55 60
 His Gln Pro Gly Val Asp Lys Pro Asp Pro Lys Thr Trp Lys Ala Asn
 65 70 75 80
 Phe Arg Cys Ala Met Asn Ser Leu Pro Asp Ile Glu Glu Val Lys Asp
 85 90 95
 Lys Ser Ile Lys Lys Gly Asn Asn Ala Phe Arg Val Tyr Arg Met Leu
 100 105 110
 Pro Leu Ser Glu Arg Pro Ser Lys Lys Gly Lys Lys Pro Lys Thr Glu
 115 120 125
 Lys Glu Asp Lys Val Lys His Ile Lys Gln Glu Pro Val Glu Ser Ser
 130 135 140
 Leu Gly Leu Ser Asn Gly Val Ser Asp Leu Ser Pro Glu Tyr Ala Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Thr Ile Lys Asn Glu Val Asp Ser Thr Val Asn Ile Ile
 165 170 175
 Val Val Gly Gln Ser His Leu Asp Ser Asn Ile Glu Asn Gln Glu Ile
 180 185 190
 Val Thr Asn Pro Pro Asp Ile Cys Gln Val Val Glu Val Thr Thr Glu
 195 200 205
 Ser Asp Glu Gln Pro Val Ser Met Ser Glu Leu Tyr Pro Leu Gln Ile
 210 215 220
 Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ala Glu Ser Glu Thr Thr Asp Ser Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Asp Glu Glu Ser Ala Glu Gly Arg Pro His Trp Arg Lys Arg Asn
 245 250 255
 Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Leu Ser Asn Met Gly Thr Arg Gly Ser Tyr
 260 265 270
 Leu Leu Pro Gly Met Ala Ser Phe Val Thr Ser Asn Lys Pro Asp Leu

275 280 285
 Gln Val Thr Ile Lys Glu Glu Ser Asn Pro Val Pro Tyr Asn Ser Ser
 290 295 300
 Trp Pro Pro Phe Gln Asp Leu Pro Leu Ser Ser Ser Met Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Ser Arg Pro Asp Arg Glu Thr Arg Ala Ser Val Ile Lys
 325 330 335
 Lys Thr Ser Asp Ile Thr Gln Ala Arg Val Lys Ser Cys
 340 345

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-gamma activated siile (GAS) consensus Sequence

< 4 0 0 > 8

ttncnnnaa

9

< 2 1 0 > 9

< 2 1 1 > 13

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-alpha stimulated response element (ISRE) consensus Sequence

< 4 0 0 > 9

ngaaanngaa act

13

< 2 1 0 > 10

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 10

ttcccagaa

9

< 2 1 0 > 11

< 2 1 1 > 13

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 11

ggaaactgaa act

13

< 2 1 0 > 12

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > ISRE-F2 probe

< 4 0 0 > 12

aatttctggg aaactgaaae tgaaaacct

29

< 2 1 0 > 13

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > ISRE-F2 probe

< 4 0 0 > 13

aattaggttt tcagtttcag tttcccaga

29

< 2 1 0 > 14

< 2 1 1 > 37

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > adp-1 probe

< 4 0 0 > 14

catggcatct acttcgtatg actattgcag agtgcc

37

< 2 1 0 > 15

< 2 1 1 > 36

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > adp-2 probe

< 4 0 0 > 15

catgggcact ctgcaatagt catacgaagt agatgc

36

< 2 1 0 > 16

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer HM2k

< 4 0 0 > 16

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

< 2 1 0 > 17

< 2 1 1 > 28

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > BST2B

< 4 0 0 > 17

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

< 2 1 0 > 18

< 2 1 1 > 28

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer 10S

< 4 0 0 > 18

tttcggtacc taattaatcc tctgcctg

28

< 2 1 0 > 19

< 2 1 1 > 23

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > GL Primer 2

< 4 0 0 > 19

ctttatgttt ttggcgtctt cca

23

< 2 1 0 > 20

< 2 1 1 > 30

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer HMP700

< 4 0 0 > 20

aaaggtacca gagtttacct ggtatcctgg

30

< 2 1 0 > 21

< 2 1 1 > 39

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer 11A'

< 4 0 0 > 21

cagaggatta attaggtacc gaaagagagg tgggctttt

39

< 2 1 0 > 22

< 2 1 1 > 24

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-F2

< 4 0 0 > 22

ttgtattgggt agcgtgaaaa aagc

24

< 2 1 0 > 23

< 2 1 1 > 24

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-R2

< 4 0 0 > 23

cagctagttc acattatctc gtcc

24

< 2 1 0 > 24

< 2 1 1 > 30

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-F1

< 4 0 0 > 24

agagggtacc atgccggtgg aaaggatgcg

30

< 2 1 0 > 25

< 2 1 1 > 30

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-R1

< 4 0 0 > 25

agtcggtacc ttaactgctc ttgacgcggg

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/21, 38/17, 39/395, 45/00, A61P35/00, 35/02, 19/00,
C12Q1/02, 1/66, 1/68, C12N15/12, C07K14/705, 16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/21, 38/17, 39/395, 45/00, A61P35/00, 35/02, 19/00,
C12Q1/02, 1/66, 1/68, C12N15/12, C07K14/705, 16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OZAKI S. et al., Interferon-alpha and -gamma enhance the HM1.24 expression of myeloma cells through the STAT-signaling pathway, Blood, 1999, Vol.94, No.10, Suppl. 1, Part 1, page 549a	1-24, 27, 28-46, 47
X	WO 94/06818 A1 (Tadatsugu TANIGUCHI) 31 March, 1994 (31.03.94), & EP 662976 A1 & US 5652095 A & US 5807836 A & JP 8-501691 A	25, 26
X	KOENING Merediz S. A. et al., Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability, Nucleic. Acids. Res., 2000, Nov. 1, Vol.28, No.21, pages 4219 to 4224	25, 26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 May, 2002 (02.05.02)	Date of mailing of the international search report 21 May, 2002 (21.05.02)
--	---

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00989

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/18997 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 22 April, 1999 (22.04.99), Especially, claims 15, 19 & EP 1023906 A1	1-24, 27, 28-46, 47
A	OZAKI S. et al., Humanized anti-HM1.24 antibody Mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells, Blood, 1999, Vol.93, No.11, pages 3922 to 3930	1-24, 27, 28-46, 47
A	EP 997152 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 03 May, 2000 (03.05.00), & WO 98/35698 A1 & JP 10-286088 A	1-24, 27, 28-46, 47
P, X	WO 01/13940 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 01 March, 2001 (01.03.01), (Family: none)	1-24, 27, 28-46, 47
P, X	WO 01/97844 A1 (Idex Pharmaceuticals Corp.), 27 December, 2001 (27.12.01), (Family: none)	1-24, 27, 28-46, 47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00989

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 48-65

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 48 to 65 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00989

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims 1 to 5 and 28 to 32 relate to HM1.24 antigen expression inducers or potentiators in tumor cells in hematopoietic organs which contain as the active ingredient interferon α , interferon γ or IRF-2 protein.

The inventions as set forth in claims 6 to 21 and 33 to 45 relate to remedies or medicinal compositions for tumor in hematopoietic organs comprising the above-described interferon α , interferon γ or IRF-2 protein per se combined with an antibody against HM1.24.

The invention as set forth in claim 22 relates to a method of screening an HM1.24 antigen expression potentiator, and the substances selected by the invention as set forth in claim 22 are used in the inventions as set forth in claims 23, 24 and 46.

In contrast thereto, the invention as set forth in claim 25 relates to a method of screening an IRF-2 protein expression potentiator but the HM1.24 antigen is not essentially required in achieving this invention.

The substances selected by the invention as set forth in claim 25 are used in the inventions as set forth in claims 26, 27 and 47.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 24 and 28 to 46 and the inventions as set forth in claims 25 to 27 and 47 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K38/21, 38/17, 39/395, 45/00, A61P35/00, 35/02, 19/00, C12Q1/02, 1/66, 1/68, C12N15/12, C07K14/705, 16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K38/21, 38/17, 39/395, 45/00, A61P35/00, 35/02, 19/00, C12Q1/02, 1/66, 1/68, C12N15/12, C07K14/705, 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	OZAKI S. et al, Interferon-alpha and -gamma enhance the HM1.24 expression of myeloma cells through the STAT-signaling pathway, Blood, 1999, Vol.94, No.10, Suppl.1, Part 1, p.549a.	1-24, 27, 28-46, 47
X	WO 94/06818 A1 (TANIGUCHI TADATSUGU) 1994.03.31 EP 662976 A1 & US 5652095 A & US 5807836 A & JP 8-501691 A	25, 26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 5 . 0 2

国際調査報告の発送日

21.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

印

4 C

9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOENING Merediz S. A. et al, Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability, Nucleic. Acids. Res., 2000 Nov 1, Vol.28, No.21, pages 4219 to 4224	25, 26
A	WO 99/18997 A1(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 1999.04.22, especially claim 15 and 19 & EP 1023906 A1	1-24, 27, 28- 46, 47
A	OZAKI S. et al, Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells, Blood, 1999, Vol.93, No.11, pages 3922 to 3930	1-24, 27, 28- 46, 47
A	EP 997152 A1(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2000.05.03 & WO 98/35698 A1 & JP 10-286088 A	1-24, 27, 28- 46, 47
PX	WO 01/13940 A1(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2001.03.01 (ファミリーなし)	1-24, 27, 28- 46, 47
PX	WO 01/97844 A1(IDEAL PHARMACEUTICALS CORPORATION) 2001.12.27 (ファミリーなし)	1-24, 27, 28- 46, 47

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 48-65 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲48乃至65記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照。)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 の続き

請求の範囲1乃至5並びに28乃至32記載の発明は、インターフェロン α 、インターフェロン γ 又はIRF-2蛋白質自体を有効成分とするHM1.24抗原の造血器腫瘍細胞における発現増強又は発現誘導剤に関するものである。

請求の範囲6乃至21並びに33乃至45記載の発明は、HM1.24抗原の発現増強又は発現誘導能を有する上記インターフェロン α 、インターフェロン γ 又はIRF-2蛋白質自体、及び、HM1.24抗原に対する抗体との併用による、造血器腫瘍の治療又は医薬組成物に係るものである。

請求の範囲22記載の発明は、HM1.24抗原の発現増強剤のスクリーニング方法に関するもの、請求の範囲23、24及び46記載の発明は、該請求の範囲22記載の発明によって選択されるものを使用するものである。

これらに対して、請求の範囲25記載の発明は、IRF-2蛋白質の発現増強剤のスクリーニング方法に関するものであるが、当該発明の達成において、HM1.24抗原は必須のものではない。

なお、請求の範囲26、27及び47記載の発明は、該請求の範囲25記載の発明によって選択されるものを使用するものである。

してみると、請求の範囲1乃至24並びに28乃至46記載の発明と、請求の範囲25乃至27並びに47記載の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらないこととなる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.